

Thèse

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Nantes
pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université

par

Michel BAILLY
Ingénieur Agricole

LES DIFFÉRENTES FORMES DE L'AZOTE DANS LES JUS ET CONCENTRÉS DE JUS DE POMME ET LEUR ÉVOLUTION PENDANT LA CONSERVATION

Soutenue le

1970

devant la Commission d'Examen

Président :

J. M. Dunoyer

Examineurs :

Y. Graff

H. Quiniou



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555016_0025

Thèse

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Nantes
pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université

par

Michel BAILLY
Ingénieur Agricole

LES DIFFÉRENTES FORMES DE L'AZOTE DANS LES JUS ET CONCENTRÉS DE JUS DE POMME ET LEUR ÉVOLUTION PENDANT LA CONSERVATION

Soutenue le

devant la Commission d'Examen

Président :

J. M. Dunoyer

Examineurs :

Y. Graff

H. Quiniou



SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I - Les protéines	1
II - Les peptides	2
III - Les amides et les acides aminés.....	2
METHODES DE DOSAGE EMPLOYEES	5
I - Azote total (méthode Kjeldahl).....	5
II - Azote ammoniacal.....	6
III - Azote de formoltitration.....	6
IV - Azote amidé.....	7
V - Azote protéinique.....	7
EVOLUTION DES COMPOSES AZOTES AU COURS DE LA FABRICATION DU JUS DE POMMES DOUCES	9
I - Analyse de l'enzyme pectinolytique et de la gélatine	10
II - Evolution des composés azotés au cours de la fabrication du jus de pommes douces n° 1	10
III - Evolution des composés azotés au cours de la fabrication du jus de pomme n° 2	16
IV - Nature des troubles et dépôts de certains jus de pomme	21
COMPARAISON DES COLLAGES A LA GELATINE ET A LA BENTONITE	23
I - Analyse de la bentonite	24
II - Analyses des jus collés à la bentonite et filtrés.....	24
III - Comparaison des moyennes entre le jus dépectinisé et le jus collé à la bentonite et filtré	25
IV - Comparaison des résultats finaux des collages à la gélatine et à la bentonite	26
V - Analyse du précipité de collage à la bentonite	28
VI - Collage à la gélatine alimentaire	30
VII - Collage à la bentonite du concentré de jus de pomme n° 1.....	31
VIII- Collage à la bentonite d'un jus de pommes aigres et d'un concentré de jus de pommes aigres.....	34
EVOLUTION DES COMPOSES AZOTES DU JUS DE POMMES DOUCES N° 1 AU COURS DE LA CONSERVATION ET DANS DES CONDITIONS DE GARDE DIFFERENTES.....	37

EVOLUTION DES COMPOSES AZOTES DANS LE CONCENTRE DE JUS DE POMME N° 1 AU COURS DE SA CONSERVATION ET DANS DES CONDITIONS DE GARDE DIFFERENTES	39
I -	39
II -- Remarques sur le trouble des dilutions de certains concentrés.....	41
ACTION DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES SUR LES COMPOSES AZOTES DES JUS DE POMME ET CONCENTRES DE JUS DE POMME	43
I - Analyse de l'enzyme	43
II - Effets de la diasproline sur les composés azotés du jus de pommes douces n° 1	43
III - Action de la diasproline sur un coupage de jus de pomme	45
IV - Chromatographie des acides aminés	47
V - Effets de la diasproline sur les composés azotés du concentré de jus de pommes douces n° 1	51
VI - Action de la diasproline sur les composés azotés d'un concentré de jus de pomme de la récolte 1966	52
BILANS DE L'AZOTE DANS LES JUS DE POMME ET CONCENTRES DE JUS DE POMME.....	57
I - Bilans de l'azote dans les jus de pomme.....	57
II - Bilans de l'azote dans les concentrés de jus de pomme.....	58
CONCLUSION.....	61
BIBLIOGRAPHIE.....	63

C'est en 1963 que nous a été posé le problème de la limpidité des concentrés de jus de pommes douces et de leurs dilutions.

La technique de fabrication étant bien définie, nous avons proposé à Monsieur BLANCHARD, Président Directeur Général de la SOCIETE DES INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES DE L'OUEST que nous remercions bien vivement de nous avoir facilité cette étude, de suivre l'évolution des différents composés azotés au cours de la fabrication des jus de pommes douces destinés à la concentration, certains d'entre eux pouvant être à l'origine de ce manque de limpidité des concentrés.

Monsieur le Professeur GRAFF, de la Faculté des Sciences de l'Université de NANTES, a bien voulu diriger ce travail et nous lui témoignons, ici, toute notre gratitude pour les nombreux conseils qu'il nous a donnés pour le mener à bien.

Nous remercions aussi Monsieur le Professeur DUNOYER, et Monsieur le Professeur QUINIOU qui ont bien voulu accepter d'examiner ce travail.

INTRODUCTION

Les composés azotés que renferme la pulpe de pomme, indiqués par WARCOLLIER (1), dans son manuel "Cidrierie", sont :

a) à l'état de matières albuminoïdes plus ou moins complexes en partie précipitables et coagulables par le tanin, en partie sous forme de matières solubles, voisines des peptones.

b/ à l'état d'amides, non précipitables par le tanin.

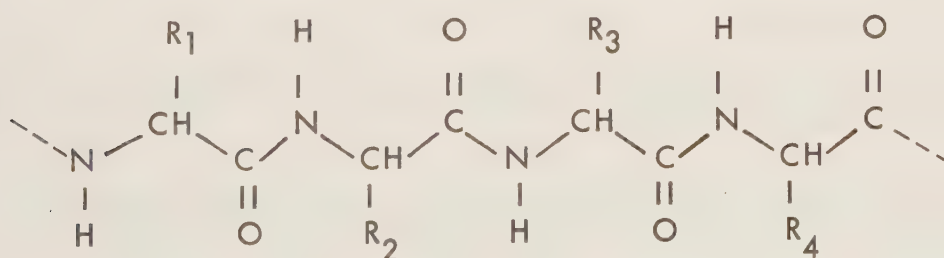
Il n'y a pas d'azote nitrique dans le moût, mais des traces d'azote ammoniacal.

Sa richesse en azote total est, en moyenne, de 100 mg par litre dont 50 % environ sont à l'état d'amides.

Aux protéines, peptones (ou plus exactement peptides), amides et sels ammoniacaux, connus dans les jus de pomme, il faut ajouter les acides aminés qui, libres ou combinés comme protéines, ont fait l'objet de très nombreux travaux depuis plusieurs années. En effet, ils sont l'une des sources principales d'azote pour les levures et ils prennent aussi une part active dans les changements chimiques qui aboutissent à une détérioration du jus dans le stockage.

I - Les protéines -

Ce sont de longues chaînes peptidiques, où des acides aminés sont disposés selon un certain ordre dans l'espace.

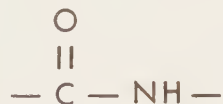


Certains dépôts que l'on trouve dans des bouteilles de jus de pomme pasteurisé sont constitués de composés de nature protéidique, comme l'ont montré Kieser, Pollard et Timberlake (2). De même, Monties et Barret (3) pensent que les protéines, naturelles du jus ou de la gélatine, sont responsables d'un trouble au froid réversible, observé dans certains jus de pomme.

II - Les peptides -

Ce sont des substances composées qui, par hydrolyse, donnent des acides aminés.

Ils sont caractérisés par la liaison peptidique :



La nature, le nombre et l'ordre dans lequel les acides aminés constitutifs se présentent, caractérisent le peptide.

De poids moléculaire moins élevés que les protéines, les peptides peuvent être aussi la cause de légers troubles ou voiles dans les jus de pomme et concentrés de jus de pomme.

III - Les amides et les acides aminés -

Une part considérable de l'azote soluble du jus de pomme est sous la forme d'aminosides libres et d'amides. Warcollier (1) indique que 50 % environ de l'azote total du moût est sous forme d'amides. Burroughs (4) précise que c'est l'asparagine qui domine, et ne donne, en % d'azote total, pour 15 jus de pomme étudiés, que 5 à 30 % d'amides. Il signale d'autre part que l'asparagine domine dans les variétés de pommes à teneur élevée en azote et qu'elle est peu représentée dans les jus pauvres en azote.

Pollart (5), résumant les travaux effectués par Hulme (6) et Lüthi (7) notamment, rappelle que les principaux acides aminés rencontrés dans les jus de pomme sont :

- l'asparagine
- l'acide aspartique
- l'acide glutamique
- la sérine
- l'alanine
- l'acide γ - aminobutyrique
- la valine
- la leucine

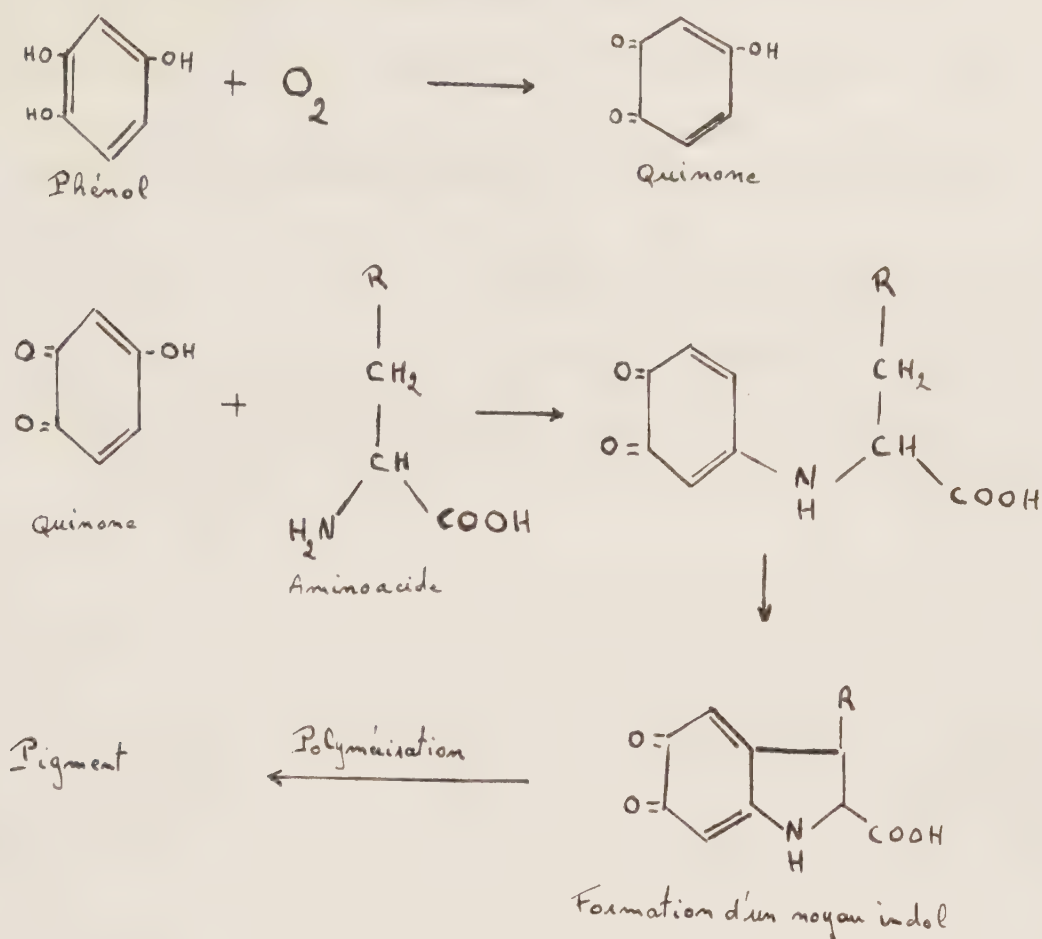
La phénylalanine, la tyrosine et la proline ont été également trouvées dans certains jus de pommes suisses ou anglaises.

Les acides aminés participent à de nombreuses réactions qui aboutissent à des transformations dans la qualité des jus et des concentrés de jus de pomme.

a) - Avec les polyphénols

Parmi les composés phénoliques des jus de pomme, cités par Williams (8), nous trouvons l'acide chlorogénique, des catéchines, des leuco-anthocyanines et des quercétrines.

Or, Büchi (9) indique une réaction entre aminoacides et polyphénols oxydés, du type suivant, et qui conduit à la formation de pigments.



Jacquin (10) rappelle que Rinderknecht et Jurd (11) ont montré que les conditions d'apparition de cette réaction de brunissement exigent la présence de 3 groupes hydroxyles libres du phénol considéré.

b) – Avec les sucres

La réaction de Maillard qui prend naissance par chauffage de protéines ou d'acides aminés en présence de sucres réducteurs, conduit à la formation de pigments bruns, des mélanoidines, et la nature des acides aminés et des sucres réducteurs joue sur l'importance du brunissement.

De nombreux auteurs ont étudié cette réaction tant dans les jus de fruits que dans les concentrés, et Patron (12) et Büchi (9), notamment, ont tenté d'en donner l'interprétation.

La réaction commencerait par la formation d'un N-oxide, et ce composé subirait un réarrangement d'Amadori pour se transformer en un amino 1 desoxy 1 d-fructose ou son énol.

Puis la réaction est mal connue.

Pendant la campagne de pommes, il arrive que des concentrés en particulier des concentrés de jus de pommes très douces, soient plus ou moins voilés.

Nous avons pensé que le collage des jus pouvait être à l'origine de ce défaut.

Aussi, dans ce travail, nous nous proposons de suivre l'évolution des différents composés azotés au cours des étapes successives de la fabrication des concentrés.

Nous comparerons, d'autre part, les résultats du collage classique à la gélatine, à ceux du collage à la bentonite.

Enfin, nous étudierons l'action d'un enzyme protéolytique sur les jus et concentrés de jus de pomme, car nous pensons que le traitement des jus, aux enzymes protéolytiques, est la cause du trouble stable de certains jus de pomme en bouteilles et de boissons à base de concentré de jus de pomme.

*

* *

METHODES DE DOSAGE EMPLOYEES

Les déterminations des composés azotés que nous allons faire sur les jus de pomme et concentrés de jus de pomme sont :

- a) l'azote total
- b) l'azote ammoniacal
- c) l'azote de formoltitration
- d) l'azote amidé
- e) l'azote protéinique

I - Azote total - (méthode Kjeldahl) -

a) - Principe - Le principe de la méthode Kjeldahl est bien connu, c'est la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium par attaque sulfurique à l'ébullition. Pour hâter la minéralisation de l'azote, on ajoute un catalyseur. Celui que nous emploierons se compose de :

- sulfate de potassium 100 g
- sulfate de cuivre 20 g
- sélénium 1 g

b) - Mode opératoire - 50 cm³ de jus de pomme ou de dilution de concentré sont placés dans un matras à col long et réduits à environ 10 cm³ par une douce ébullition.

On ajoute 20 cm³ d'acide sulfurique pur, 1 g environ de catalyseur de minéralisation et quelques pierres ponce.

L'attaque sulfurique est conduite doucement au départ, puis plus activement jusqu'à décoloration complète.

A partir de ce moment, on continue à faire bouillir pendant 1 heure pour être certain de la minéralisation totale de l'azote.

On laisse refroidir, ajoute 50 cm³ environ d'eau distillée, mélange et transvase le liquide dans un ballon à distillation. Le matras est rincé plusieurs fois à l'eau distillée, et on amène à 200-250 cm³ le liquide à distiller du ballon.

On ajoute une petite pincée de poudre de zinc, quelques gouttes de phénolphtaléine et 100 cm³ de lessive de soude à 36 ° Baumé. On ferme immédiatement le ballon avec le bouchon muni d'un séparateur Kjeldahl et distille.

On reçoit le distillat dans 10 cm³ d'acide sulfurique N/10 ou N/20 où on a ajouté quelques gouttes d'hélianthine.

On arrête la distillation quand un peu plus de la moitié du ballon a distillé.

Ensuite, on titre en retour avec de la soude N/10 ou N/20 jusqu'au virage jaune franc de l'indicateur coloré.

c) - Calculs - Soit V cm³ le nombre de centimètres cubes de soude versé.

La teneur en azote total des 50 cm³ de jus est :

- avec de la soude N/10 : $(10 - V) \times 1,4$ mg

- avec de la soude N/20 : $(10 - V) \times 0,7$ mg

II - Azote ammoniacal -

a) - Principe - L'ammoniaque se trouvant à l'état de sels d'ammonium dans les jus, son dosage consiste à déplacer NH₄ OH par un alcali et à recueillir ensuite NH₃ par distillation.

b) - Mode opératoire - 50 cm³ de jus sont placés dans un ballon à distillation et approximativement neutralisés jusqu'à pH = 7 avec de la soude normale.

On ajoute ensuite un excès de magnésie calcinée, amenant le milieu à un pH voisin de 9, quelques pierres ponce et porte le volume à environ 200 cm³ avec de l'eau distillée.

On distille et recueille la moitié du volume du liquide dans 10 cm³ d'acide sulfurique N/20.

On titre en retour avec de la soude N/20 en présence d'hélianthine.

c) - Calculs - Soit V cm³ le nombre de centimètres cubes de soude versé, la teneur en azote ammoniacal des 50 cm³ de jus est :

$$(10 - V) \times 0,7 \text{ mg}$$

III - Azote de formoltitration - (méthode Soërensén, modifiée par Ditz (14)) -

d) - Principe - La méthode Soërensén consiste à bloquer la fonction amine par addition de formol. L'équilibre entre les fonctions amine et acide se trouve rompu, et la fonction acide peut alors être titrée par un alcali.

NH₄ étant également bloqué par le formol, les sels d'ammonium laissent titrer leur acide et on obtient ainsi, par formoltitration la somme azote aminé + azote ammoniacal.

Il faut remarquer aussi que les groupements NH₂ situés en bout de chaînes peptidiques sont encore bloqués.

b) Mode opératoire - L'azote de formoltitration est déterminé à l'aide d'un pH-mètre.

50 cm³ de jus sont neutralisés approximativement avec de la soude 2 N, puis amenés à pH = 8,5 par de la soude N/10. On note le volume total de liquide et on ajoute un volume égal de solution de formol préalablement amenée à pH = 8,5.

On titre à nouveau avec de la soude N/10 jusqu'à pH = 8,5.

c) Calculs - Si V cm³ est le volume de soude N/10 versé pour ramener le liquide à pH = 8,5.

la somme : azote aminé + azote ammoniacal = $1,4 \times V$ mg.

L'azote de formoltitration est obtenu après déduction de l'azote ammoniacal.

IV - Azote amidé -

a) Principe - Pour ce dosage, on hydrolyse à reflux, en solution chlorhydrique, le jus de pomme et on dose l'azote ammoniacal libéré.

Par différence avec l'azote ammoniacal dosé précédemment, on obtient l'azote amidé.

b) Mode opératoire - 50 cm³ de jus de pomme sont placés dans un ballon à col rodé, adaptable à un réfrigérant ascendant.

On ajoute 50 cm³ d'eau distillée, 10 cm³ d'acide chlorhydrique fumant (à 22° Baumé) et quelques pierres ponce.

Après 30 minutes d'ébullition on admet que l'hydrolyse est complète. On refroidit et titre l'azote ammoniacal libéré comme indiqué précédemment. L'excès d'acide chlorhydrique est neutralisé avant addition de la magnésie calcinée.

c) Calculs - Si V cm³ est le nombre de centimètres cubes de soude N/20 versé,

$(10 - V) \times 0,7$ mg représente la somme de l'azote ammoniacal libéré par hydrolyse et l'azote ammoniacal initialement présent.

L'azote amidé s'obtient par différence.

V - Azote protéinique -

C'est la fraction de l'azote organique précipitable par l'acide phosphotungstique en milieu sulfurique.

Mode opératoire - 50 cm³ de jus sont réduits sous vide à 20-25 cm³ environ.

On acidifie par $0,5 \text{ cm}^3$ d'acide sulfurique concentré, puis on ajoute 5 cm^3 de réactif phosphotungstique (solution saturée d'acide phosphotungstique, N en acide sulfurique).

Il se forme rapidement un précipité. Après 2 jours de repos, on filtre. Le dépôt adhère aux parois ; on lave plusieurs fois le précipité dans le ballon et le filtre avec une solution d'acide sulfurique N/1 contenant 20 g/litre d'acide phosphotungstique.

Après séchage du filtre, on minéralise dans le ballon ayant servi à la précipitation, suivant la méthode de dosage d'azote total.

*

En appliquant ces méthodes de dosage, on ne peut éviter certaines causes d'erreur, indépendantes les unes des autres, mais qui ne peuvent permettre une précision suffisante.

Aussi, avons-nous eu recours à la méthode statistique pour petits échantillons, qui permet :

- d'une part, d'obtenir la moyenne d'une série de titrations avec ses limites de confiance,

- d'autre part, de comparer deux moyennes entre elles pour savoir si elles sont ou non significativement différentes.

*

* *

EVOLUTION DES COMPOSES AZOTES AU COURS DE LA FABRICATION DU JUS DE POMMES DOUCES

Pour suivre l'évolution des composés azotés du jus de pomme, au cours de sa fabrication, nous avons eu à notre disposition :

1°/ au mois de janvier 1966, un lot de plusieurs dizaines de tonnes de pommes douces, de variétés et d'origine diverses.

2°/ au mois d'octobre 1966, des pommes douces récoltées dans la Sarthe et les départements limitrophes.

A la sortie des presses, deux cuves de 140 hl sont remplies de jus préchauffé à 40 - 42° C pour y être dépectinisé. La dépectinisation, conduite à cette température, dure environ six heures.

Le jus est ensuite refroidi à 15 - 18°, envoyé dans une cuve de collage de 170 hl puis filtré sur kieselghur.

Il est enfin mis en bouteilles, pasteurisé et conservé au frais dans la cave de garde de l'usine.

Des échantillons sont prélevés :

- 1) dans les 2 cuves de dépectinisation, avant addition de l'enzyme pectinolytique, pour avoir du jus brut (85 hl de jus de chacune de ces cuves allant ensuite dans la cuve de collage de 170 hl)
- 2) dans la cuve de collage, de 170 hl, avant le collage, pour avoir du jus dépectinisé.
- 3) à la sortie du filtre, pour avoir du jus collé à la gélatine et filtré.

A tous ces échantillons, on ajoute du benzoate de soude, pour assurer leur conservation.

Les principales caractéristiques des jus de pomme étudiés sont :

	Jus de pomme n° 1 fabriqué en janvier 1966	Jus de pomme n° 2 fabriqué en octobre 1966
densité	1.043	1.049
acidité totale..... (exprimée en acide malique)	1,7 g/l	3,15 g/l

I - Analyse de l'enzyme pectinolytique et de la gélatine -

La dépectinisation des 2 jus de pomme a été réalisée avec du pectinol concentré 4 fois, c'est-à-dire avec une enzyme d'activité 4 fois plus grande que celle de l'enzyme ordinaire, et le collage a été fait avec une solution de gélatine en perles.

Les déterminations des différentes formes de l'azote, dans ces produits, ont donné les résultats suivants (en mg d'azote pour 100 mg).

Pectinol

	Nombre de mesures	Moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
N total	10	1,54	0,062
N ammoniacal	10	0,77	0,0208
N aminé	10	0	0
N amidé	10	0,028	0,015
N protéinique	10	1,015	0,036

Tableau n° 1

Gélatine

	Nombre de mesures	Moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
N total	10	14,581	0,064
N ammoniacal	10	0,2695	0,0074
N aminé	10	1,5365	0,089
N amidé	10	0,2345	0,0012
N protéinique	10	14,056	0,0357

Tableau n° 2

II - Evolution des composés azotés au cours de la fabrication du jus de pommes douces n° 1 -

Pour la dépectinisation de ce jus, on a employé 19,5 g de pectinol concentré par hectolitre et le collage a été réalisé à raison de 79,5 g de gélatine par hectolitre.

a) - Apports d'azote par le pectinol et la gélatine

Puisque tous les résultats sont exprimés pour 50 cm³ de jus, l'apport d'azote, sous ses différentes formes, par le pectinol et la gélatine, à ce volume unité choisi, est :

	<u>Pectinol</u> mg N 2	<u>Gélatine</u> mg N 2
Azote total	0,150	5,80
Azote ammoniacal	0,075	0,10
Azote de formoltitration.....	—	0,61
Azote amidé.....	—	0,09
Azote protéinique	0,100	5,59

Nous tiendrons compte de ces apports lors de nos calculs, pour la comparaison des moyennes entre deux étapes successives de la fabrication.

b) - Evolution de l'azote total

Les résultats sont exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé et pasteurisé
nombre de mesures	10	10	11	10
moyenne $\bar{x}$	2,751	2,436	2,7745	2,6845
écart-type de la moyenne	0,0418	0,121	0,084	0,038

La comparaison des moyennes, entre deux étapes successives de la fabrication, donne pour t les valeurs suivantes :

- entre le jus brut, et
le jus dépectinisé $t = 2,44$
- entre le jus dépectinisé et le
jus collé et filtré $t = 2,299$
- entre le jus collé, filtré, et le
jus embouteillé et pasteurisé..... $t = 0,92$

Puisque nous choisissons 5 % comme seuil de signification, nous constatons que les comparaisons des moyennes

entre le jus brut et le jus dépectinisé,
entre le jus dépectinisé et le jus collé à la gélatine et filtré

sont significatives.

Par contre, le résultat de la comparaison des moyennes entre le jus collé à la gélatine et filtré, et le même jus mis en bouteilles et pasteurisé, n'est pas significatif.

Le graphique ci-contre, figure n° 2, représente l'ensemble de ces résultats, c'est-à-dire les valeurs moyennes trouvées ainsi que leurs dispersions (partie hachurée).

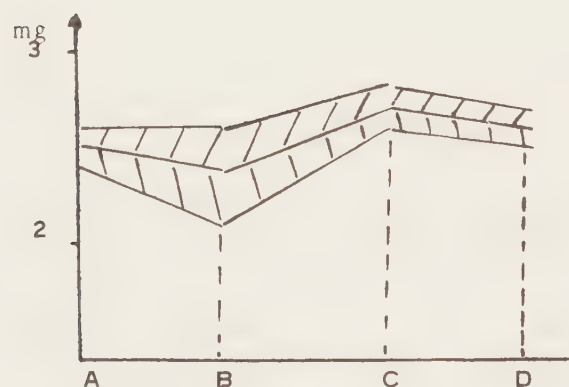


Figure n° 2

A = jus brut

B = jus dépectinisé

C = jus dépectinisé, collé à la gélatine et filtré

D = jus mis en bouteilles et pasteurisé.

Malgré l'apport d'azote total par le pectinol, 0,15 mg à 50 cm³ de jus, nous trouvons 11 % de moins d'azote total dans le jus dépectinisé que dans le jus brut.

La dépectinisation dure six heures environ et le jus de pomme est maintenu à une température voisine de 42° C pendant tout ce temps.

Il est donc probable que des composés azotés s'insolubilisent et précipitent dans les lies, en se combinant à des polyphénols du jus.

Par contre, la gélatine, en se combinant au tanin du jus pour en permettre sa clarification, laisse, en solution, une quantité appréciable d'azote puisqu'après collage on trouve 2,7745 mg d'azote total pour 50 cm³ de jus, soit environ 14 % de plus.

c) — Evolution de l'azote ammoniacal

Résultats exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé et pasteurisé
nombre de mesures	10	10	10	10
moyenne $\bar{x}$	0,3675	0,392	0,2695	0,315
écart-type de la moyenne	0,0058	0,0113	0,018	0,0237

Les teneurs moyennes en azote ammoniacal, du jus brut, du jus dépectinisé et du jus mis en bouteilles et pasteurisé, sont sensiblement les mêmes.

Par contre, la moyenne de la teneur en azote ammoniacal de l'échantillon de jus collé à la gélatine et filtré est nettement différente des autres.

Le test "t" de la comparaison des moyennes entre deux étapes successives de la fabrication donne, en effet :

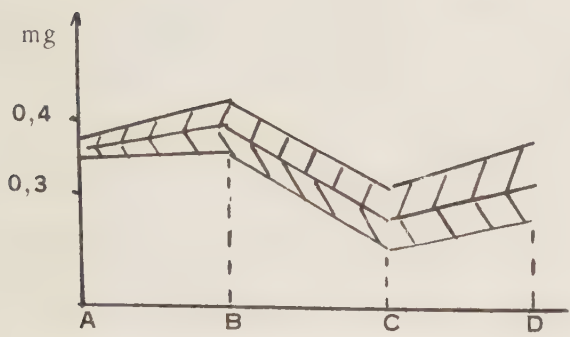


Figure n° 3

- entre le jus brut, et le jus dépectinisé $t = 1,909$
- entre le jus dépectinisé et le jus collé et filtré .. $t = 5,72$
- entre le jus collé, filtré et le jus embouteillé, pasteurisé $t = 1,52$

La figure n° 3 ci-contre, illustre ces résultats et fait ressortir l'anomalie observée pour le jus collé à la gélatine et filtré.

d) – Evolution de l'azote de formoltitration

Résultats exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé pasteurisé
Nombre de mesures	10	10	11	11
Moyennes $\bar{x}$	0,9765	0,574	0,6505	0,833
Ecart-type de la moyenne	0,098	0,1144	0,064	0,1021

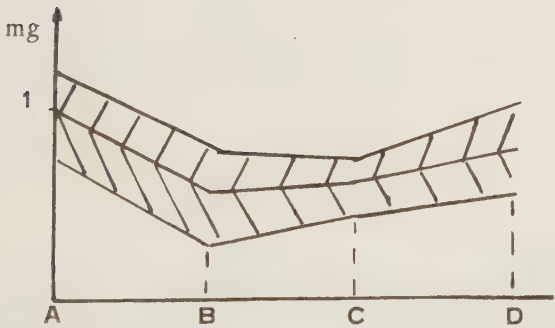


Figure n° 4

La comparaison des moyennes entre deux étapes successives de la fabrication donne :

- entre le jus brut et le jus dépectinisé $t = 2,65$
- entre le jus dépectinisé et le jus collé et filtré $t = 1,36$
- entre le jus collé, filtré et le jus embouteillé et pasteurisé $t = 3,52$

Après la dépectinisation du jus, il y a moins d'azote de formoltitration. Cette diminution de l'azote aminé dans le jus dépectinisé est à rapprocher de celle de l'azote total correspondant.

D'autre part, il est logique de trouver un peu plus d'azote de formoltitration dans le jus mis en bouteille et pasteurisé, puisque la gélatine en apporte au collage.

e) — Evolution de l'azote amidé

Résultats exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé pasteurisé
nombre de mesures	10	10	10	10
moyenne $\bar{x}$	0,168	0,0406	0,1855	0,112
écart-type de la moyenne	0,0105	0,0141	0,019	0,0145

La comparaison des moyennes entre 2 étapes successives de la fabrication, donne pour t , les valeurs suivantes :

- entre le jus brut et le jus dépectinisé $t = 7,2$
- entre le jus dépectinisé et le jus collé et filtré $t = 5,8$
- entre le jus collé, filtré et le jus embouteillé, pasteurisé $t = 2,95$

Tous les résultats sont significatifs.

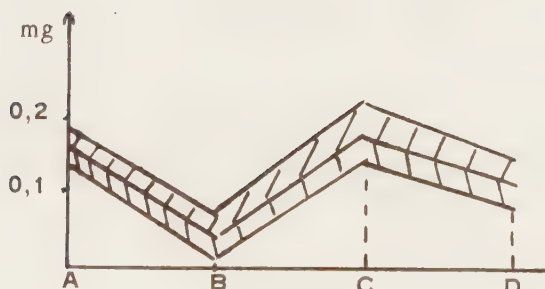


Figure n° 5

Comme pour l'azote de formoltitration, on observe qu'après dépectinisation, le jus renferme moins d'azote amidé que le jus brut.

Après collage à la gélatine, la teneur en azote amidé passe de 0,0406 mg pour 50 cm³ à 0,1855 mg. La quantité d'azote amidé apportée par cette colle à 50 cm³ de jus, est de 0,09 mg. On la retrouve dans le jus dépectinisé.

Enfin, après mise en bouteilles et pasteurisation, il n'y a plus que 0,112 mg d'azote amidé. Cette diminution pourrait être due à la formation de composés insolubles avec des polyphénols du jus favorisée par la pasteurisation.

Cette variation continue de l'azote amidé, pendant la fabrication, est illustrée par la figure n° 5.

f) - Evolution de l'azote protéinique

Résultats exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé pasteurisé
Nombre de mesures	10	10	10	10
moyenne $\bar{x}$	1,7395	1,5785	1,400	1,295
écart-type de la moyenne	0,097	0,042	0,082	0,028

Les valeurs de t sont les suivantes :

- entre le jus brut et le
jus dépectinisé $t = 1,51$
- entre le jus dépectinisé et
le jus collé..... $t = 1,92$
- entre le jus collé et filtré et
le jus embouteillé et pasteurisé..... $t = 1,20$

Il n'y aurait pas de variation dans la teneur en azote protéinique, au cours de la fabrication du jus de pomme, puisque le test t , entre deux étapes de la fabrication, ne donne pas de résultat significatif.

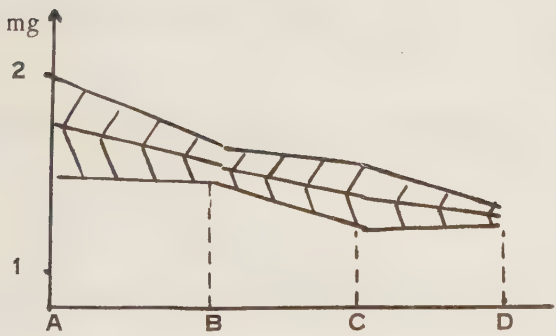


Figure n° 6

Mais, si l'on observe la courbe représentative, figure n° 6, on remarque que cette courbe décroît régulièrement de la valeur moyenne trouvée pour le jus brut, à celle qui a été observée dans le jus mis en bouteilles et pasteurisé.

On a confirmation de cette diminution en comparant la moyenne trouvée dans le jus brut, à celles que l'on a dans le jus collé à la gélatine et filtré, et dans le jus mis en bouteilles, et pasteurisé ($t = 2,6$ dans le premier cas, et $4,38$ dans le second).

Ce jus de pommes douces, d'acidité très faible, 1,7 g/l exprimée en acide malique, est aussi relativement pauvre en azote total, 55,02 mg/litre, et on a vu qu'il en disparaissait pendant la dépectinisation.

Environ 11 % d'azote total est éliminé dans les lies, probablement combiné à des polyphénols, et ce sont des acides aminés et des amides qui réagissent, avec ces constituants.

En effet, on trouve 0,40 mg d'azote aminé de moins dans le jus dépectinisé et 0,127 mg de moins d'azote amidé.

En tenant compte de l'azote total apporté par le pectinol, ces 0,40 mg d'azote de formoltitration et 0,127 mg d'azote amidé ajoutés aux 2,436 mg d'azote total des 50 cm³ du jus dépectinisé, redonnent bien, à 1 % près environ, la valeur moyenne de l'azote total trouvée dans le jus brut.

Une fois dépectinisé, le jus est collé à la gélatine et filtré. On a vu alors que sa teneur en azote total passait de 2,436 mg, pour 50 cm³ de jus, à 2,7745 mg soit une augmentation de près de 14 %, et on a mis en évidence un enrichissement en azote amidé du jus collé et filtré.

La gélatine laisse donc en solution dans le jus, une quantité non négligeable d'azote. Il y a eu ainsi surcollage qui se traduit, par la suite, par un trouble dans le jus embouteillé et pasteurisé.

D'autre part, dans le jus embouteillé et pasteurisé, il y a un peu plus d'azote de formoltitration et un peu moins d'azote amidé que dans le jus collé et filtré.

La pasteurisation des jus en bouteilles s'effectuant à 72 ° C pendant 20 minutes, a dû, vraisemblablement provoquer un début d'hydrolyse partielle de grosses molécules azotées, libérant ainsi des amino-acides, et détruire des amides. Mais nous n'avons pas pu mettre en évidence une diminution de la teneur en azote protéinique et une légère augmentation de l'azote ammoniacal, correspondantes, dans le jus embouteillé et pasteurisé.

En ce qui concerne l'azote protéinique, il n'y aurait pas de variation de cette forme de l'azote au cours de la fabrication, mais en observant la courbe représentative, figure n° 6, de son évolution, aux différents stades, on remarque qu'elle décroît régulièrement, du jus brut au jus embouteillé et pasteurisé.

Les modifications des teneurs en cette forme de l'azote ne sont pas décelables à l'analyse, avec la méthode que nous avons adoptée.

Enfin, pour l'azote ammoniacal, nous ne pouvons expliquer sa diminution dans le jus collé et filtré alors que la gélatine en laisse 0,10 mg en solution.

III - Evolution des composés azotés au cours de la fabrication du jus de pomme n° 2 -

Pour dépectiniser ce jus, on emploie 18 g/hl de pectinol concentré et, pour le collage, 45 g/hl de gélatine.

Les durées de la dépectinisation et du collage sont les mêmes que celles qui ont été maintenues pour le jus n° 1.

a) – Apports d'azote par le pectinol et la gélatine à 50 cm³ de jus

	Pectinol mg N	Gélatine mg N
Azote total	0,14	3,28
Azote ammoniacal	0,07	0,06
Azote aminé.....	–	0,35
Azote amidé.....	–	0,05
Azote protéinique.....	0,09	3,16

b) – Evolution de l'azote total

Résultats exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé pasteurisé
Nombre de mesures	10	10	10	10
moyenne $\bar{x}$	4,522	4,48	4,214	4,025
écart-type de la moyenne	0,066	0,041	0,049	0,039

Comparaison des moyennes entre 2 étapes successives de la fabrication :

- entre le jus brut et
le jus dépectinisé t = 0,53
- entre le jus dépectinisé et
le jus collé et filtré..... t = 4,15
- entre le jus collé, filtré et
le jus embouteillé et pasteurisé t = 2,97

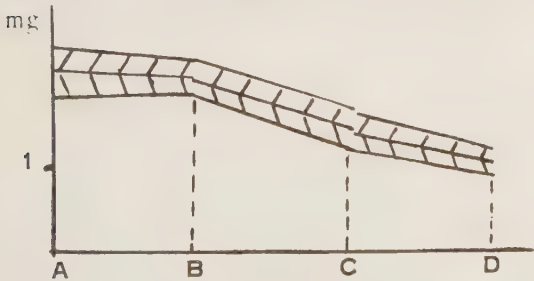


Figure n° 7

Pour ce jus de pomme, beaucoup plus riche en azote total que le précédent et aussi, plus acide, le collage à la gélatine lui enlève environ 6 % d'azote total, alors que pour le jus n° 1, la gélatine en abandonnait, en solution, près de 14 %.

c) – Evolution de l'azote ammoniacal

Résultats exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé pasteurisé
nombre de mesures	10	5	10	10
moyenne $\bar{x}$	0,3115	0,266	0,4165	0,406
écart-type de la moyenne	0,015	0,013	0,009	0,011

La comparaison des moyennes entre 2 étapes successives de la fabrication, donne, pour t , les valeurs suivantes :

- entre le jus brut, et
le jus dépectinisé $t = 1,89$
- entre le jus dépectinisé et
le jus collé et filtré $t = 8,7$
- entre le jus collé, filtré et
le jus embouteillé, pasteurisé $t = 0,65$

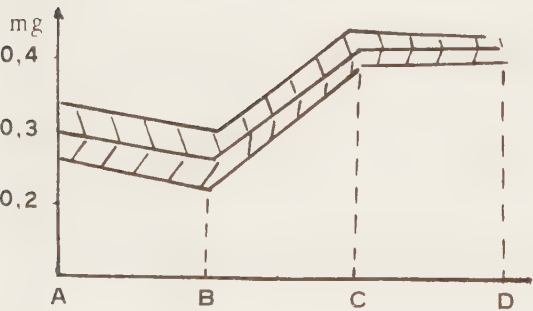


Figure n° 8

Le pectinol, la gélatine, apportent de l'azote ammoniacal.

Si l'on ne trouve pas un enrichissement du jus dépectinisé en cette forme de l'azote, par contre, dans le jus collé à la gélatine et filtré, cet apport d'azote ammoniacal est décelé à l'analyse.

Les variations de l'azote ammoniacal dans ce jus, au cours de sa fabrication, sont illustrées par le graphique ci-contre, figure n° 8.

d) — Evolution de l'azote de formoltitration

Résultats exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé pasteurisé
nombre de mesures	10	10	10	10
moyenne $\bar{x}$	2,1105	2,324	2,3345	2,6915
écart-type de la moyenne	0,104	0,081	0,056	0,101

Le test t de la comparaison des moyennes donne :

- entre le jus brut et le jus dépectinisé $t = 1,61$
- entre le jus dépectinisé et le jus collé et filtré..... $t = 0,106$
- entre le jus collé, filtré et le jus embouteillé et pasteurisé..... $t = 3,22$

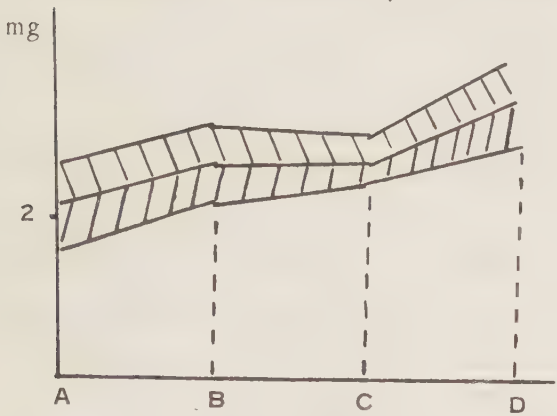


Figure n° 9

La dépectinisation et le collage n'ont pas modifié la teneur en azote de formoltration du jus ; mais après mise en bouteilles et pasteurisation à 72-75°C pendant 20 minutes, on en trouve sensiblement plus, comme le montre le graphique n° 9.

e) - Evolution de l'azote amidé (en mg d'azote pour 50 cm³ de jus)

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé pasteurisé
nombre de mesures	10	10	10	10
moyenne $\bar{x}$	0,623	1,0255	0,7245	0,714
écart-type de la moyenne	0,029	0,024	0,0075	0,015

Entre deux étapes de la fabrication, nous avons, pour t , les valeurs suivantes :

- entre le jus brut et le jus dépectinisé..... $t = 10,5$
- entre le jus dépectinisé et le jus collé à la gélatine et filtré $t = 11,8$
- entre le jus collé, filtré et le jus embouteillé, pasteurisé $t = 0,60$

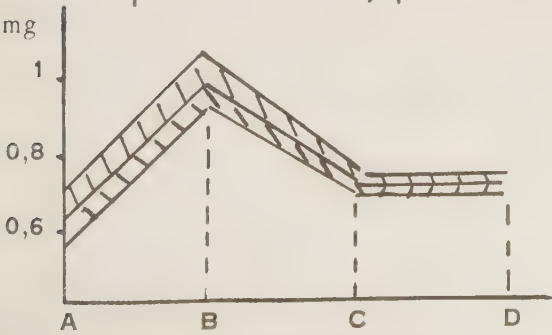


Figure n° 10

Puisque le pectinol n'apporte pas d'azote amidé, l'augmentation de la teneur en cette forme de l'azote, dans le jus dépectinisé, ne pourrait être due qu'à l'hydrolyse d'autres composés azotés de poids moléculaires plus élevés.

Le collage, d'autre part, en élimine dans les lies.

Ces résultats sont illustrés par la figure n° 10 ci-dessus.

f) — Evolution de l'azote protéinique (en mg d'azote pour 50 cm³ de jus)

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé et filtré	jus embouteillé pasteurisé
nombre de mesures	10	10	10	10
moyenne $\bar{x}$	1,5015	1,435	1,19	1,162
écart-type de la moyenne	0,046	0,064	0,034	0,0607

Valeurs de t :

- entre le jus brut et le
jus dépectinisé..... $t = 0,8$
- entre le jus dépectinisé et le
jus collé, filtré..... $t = 3,35$
- entre le jus collé, filtré et le
jus embouteillé $t = 0,39$

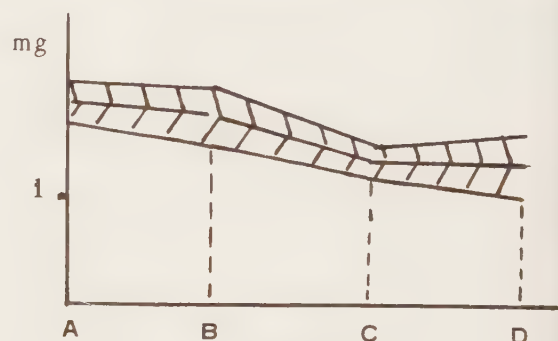


Figure n° 11

Le collage élimine des protéines dans les lies.

Remarquons tout d'abord que ce jus de pomme, plus acide que le premier (3,15 g/l d'acidité totale exprimée en acide malique), est aussi plus riche en azote total, 90,44 mg/l.

Pour ce jus de pomme, le collage a été mieux réussi que pour le premier, puisqu'il y a eu environ 6 % d'azote total qui ont été éliminés dans les lies.

La légère diminution de la teneur en azote total constatée dans le jus embouteillé et pasteurisé correspond vraisemblablement, d'autre part, à celle de l'azote protéinique du même jus bien que le test t n'ait pas permis de le mettre en évidence.

Si l'on ne constate pas de variation de la teneur moyenne en azote de formoltitration dans ce jus, jusqu'à son embouteillage, on en trouve sensiblement plus dans le jus embouteillé et pasteurisé, environ 15 %. Dans ce cas encore, il n'a pas été possible de mettre en évidence une diminution de l'azote protéinique correspondante. Cet azote de formoltitration ne peut provenir, sans aucun doute, que de l'hydrolyse d'autres composés azotés de poids moléculaires plus élevés, favorisée par la pasteurisation elle-même.

IV - Nature des troubles et dépôts de certains jus de pomme -

Peu de temps après la mise en bouteilles et pasteurisation du jus de pomme n° 1, celui-ci devient trouble et un dépôt se rassemble dans le fond des bouteilles.

Il arrive aussi quelquefois que des jus de pomme, en bouteilles ou en boîtes, soient troubles sans déposer.

Ces troubles et dépôts sont d'aspect différent.

Le dépôt et le trouble du jus de pomme n° 1, séparé par filtration, est grumeleux, de couleur blanc-grisâtre. Le filtrat est encore trouble, mais par chauffage ce trouble disparaît. En refroidissant, le trouble réapparaît, et cela est une des caractéristiques des troubles d'origine protéidique.

Pour les jus de pomme conditionnés en bouteilles ou en boîtes et qui sont plus ou moins troubles, sans qu'il y ait de dépôt, on retient sur le filtre un précipité formant des taches brunes. Le filtrat, dans ce cas, est limpide et brillant et ne change pas par chauffage.

a) - Dépôt du jus de pomme n° 1

Les quantités d'azote total trouvées dans les dépôts de deux litres de ce jus, sont :

0,364 mg/l et 0,840 mg/l

b) - Bouteille de jus de pomme trouble

Le jus de pomme d'une bouteille d'un litre d'un embouteillage de février 1966 et qui a troublé, est filtré sur papier.

Le filtrat est limpide.

La quantité d'azote total trouvée dans le précipité est de 0,476 mg.

Les troubles qui apparaissent ainsi dans certains jus de pomme sont provoqués par des composés azotés, mais selon que le trouble est ou n'est pas stable à la chaleur, leur nature paraît différente.

Des protéines, naturelles du jus ou apportées par la gélatine ou des peptides, seraient à l'origine du trouble réversible du jus de pomme n° 1.

Le précipité isolé du jus de pomme, embouteillé depuis quelques mois et présentant un trouble irréversible, serait dû à des combinaisons polyphénols-aminoacides ou peptones.

COMPARAISON DES COLLAGES A LA GELATINE ET A LA BENTONITE

Le collage est, pratiquement, l'opération essentielle de la fabrication des jus de pomme destinés à la concentration. De sa réussite dépend la qualité du concentré, la limpidité.

En général, on emploie de la gélatine qui est une substance mal définie et dont on connaît mal la structure.

Elle est formée de longues chaînes polypeptidiques où le glycolle et la proline sont les acides aminés les plus importants.

En présence de tanin, la gélatine provoque une floculation qui clarifie le jus.

La combinaison du tanin et de la gélatine n'est pas un composé défini ; le précipité formé résulte d'une adsorption de tanin par la gélatine et sa composition est très variable selon les concentrations de tanin et de gélatine et selon les conditions du milieu (acidité réelle, température, présence de fer, etc ...).

Dans certains cas, la précipitation de la gélatine par le tanin n'est pas toujours complète, il y a alors surcollage.

Les points de colle, c'est-à-dire les quantités de gélatine à ajouter par hectolitre de jus, sont déterminés au laboratoire après essais en éprouvettes. Ils sont de 79,5 g pour le jus de pomme n° 1 et de 45 g pour le jus n° 2.

Pour éviter le risque de surcollage, dans le cas du jus de pommes douces, nous avons collé à la bentonite des échantillons des deux jus de pomme, n° 1 et n° 2, puis nous avons comparé les résultats des collages à la gélatine et à la bentonite.

La bentonite, en effet, est une argile colloïdale, de la famille des silicates d'aluminium hydratés, et qui agit différemment de la gélatine pour la clarification des jus.

Elle fixe énergiquement les protéines et ne donne pratiquement lieu à aucune réaction avec le milieu. Elle adsorbe aussi des composés azotés de poids moléculaires plus faibles : peptones et poly-peptides.

Avant l'addition de la solution de gélatine, on prélève dans la cuve de collage, six litres de jus qui sont collés à la bentonite au laboratoire.

Pour le jus n° 1 comme pour le jus n° 2, on ajoute 450 mg de bentonite par litre de jus pour réaliser le collage.

I - Analyse de la bentonite -

Cette colle pouvant apporter de l'azote ammoniacal au jus, on recherche cette forme de l'azote dans une émulsion de bentonite à 1 ‰ dans de l'eau distillée.

Pour 100 mg de bentonite, la moyenne de 10 dosages ressort à $\bar{x} = 0,294$ mg (en mg d'azote).

L'écart-type de cette moyenne est : 0,093

La bentonite apporte donc 0,066 mg d'azote ammoniacal à 50 cm³ de jus.

II - Analyses des jus collés à la bentonite et filtrés -

Après collage, les jus sont filtrés sur kieselghur dans les mêmes conditions que les jus collés à la gélatine.

Les résultats ci-après sont exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

a) - jus de pomme n° 1

	Nombre de mesures	Moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	1,9145	0,050
Azote ammoniacal	10	0,574	0,010
Azote de formoltitration	11	0,565	0,054
Azote amidé	10	0,0854	0,018
Azote protéinique	10	0,9695	0,061

b) - jus de pomme n° 2

	Nombre de mesures	Moyenne $\bar{x}$	Ecart-type de la moyenne
Azote total	10	4,039	0,045
Azote ammoniacal	5	0,35	0,063
Azote de formoltitration	10	2,366	0,042
Azote amidé	10	0,749	0,016
Azote protéinique	10	0,98	0,035

III - Comparaison des moyennes entre le jus dépectinisé et le jus collé à la bentonite et filtré -

a) - jus de pomme n° 1

Dans les tableaux récapitulatifs suivants, nous avons rassemblé les moyennes de chacune des diverses formes de l'azote, dans le jus dépectinisé et le jus collé à la bentonite et filtré, ainsi que les valeurs de t , des comparaisons de ces moyennes.

	jus dépectinisé	jus collé à la bentonite filtré	t
Azote total	2,436	1,9145	3,9
Azote ammoniacal	0,392	0,574	12,1
Azote de formoltitration	0,574	0,565	0,07
Azote amidé	0,0406	0,0854	1,90
Azote protéinique	1,5785	0,9695	8,15

Les 21,4 % d'azote total qu'enlève la bentonite au jus dépectinisé, sont de l'azote protéinique comme le montre ce tableau.

On constate, d'autre part, que la bentonite n'agit ni sur les acides aminés ni sur les amides, dont les teneurs moyennes ne varient pas ; par contre, on relève son apport d'azote ammoniacal au jus collé à la bentonite.

b) - jus de pomme n° 2

	jus dépectinisé	jus collé à la bentonite filtré	t
Azote total	4,48	4,039	4,15
Azote ammoniacal	0,266	0,350	3,20
Azote de formoltitration	2,324	2,366	0,45
Azote amidé	1,0255	0,749	9,4
Azote protéinique	1,435	0,980	6,16

Pour ce jus de pomme, le collage à la bentonite lui enlève 9,8 % d'azote total.

Après collage, le jus renferme moins de protéines et aussi moins de composés amidés, ce que nous n'avions pas observé pour le jus n° 1.

IV - Comparaison des résultats finaux des collages à la gélatine et à la bentonite -

Une fois collés et filtrés, ces jus sont concentrés sous vide. Il est donc intéressant de comparer leurs teneurs respectives, définitives, en ces divers composés azotés, et nous avons rassemblé dans le tableau ci-dessous, les moyennes trouvées et donné les valeurs de " t " des comparaisons des moyennes.

<u>jus n° 1</u>	jus collé à la gélatine	jus collé à la bentonite	t
Azote total	2,7745	1,9145	15,27
Azote ammoniacal	0,2695	0,574	14,50
Azote aminé	0,5997	0,565	0,54
Azote amidé	0,1855	0,0854	3,60
Azote protéinique	1,400	0,9695	4,10
<u>jus n° 2</u>	jus collé à la gélatine	jus collé à la bentonite	t
Azote total	4,214	4,039	2,6
Azote ammoniacal	0,4165	0,350	3,27
Azote aminé	2,3345	2,366	0,44
Azote amidé	0,7245	0,749	1,36
Azote protéinique	1,19	0,98	4,4

Interprétation des résultats

On a vu au chapitre précédent, que le jus de pomme n° 1 avait été involontairement surcollé, sa teneur en azote total passant de 2,436 mg avant le collage à la gélatine, à 2,7745 mg après collage et filtration.

Avec la bentonite et en ne collant qu'à 45 g/hl, au lieu de 79,5 g/hl de gélatine, le jus filtré ne renferme plus que 1,9145 mg d'azote total, soit 21,4 % de moins que le jus dépectinisé et 30 % de moins que le jus brut.

Pour le jus de pomme n° 2, plus acide, le collage à la gélatine a été réussi, mais la bentonite enlève, au jus dépectinisé, un peu plus de composés azotés que la gélatine, environ 10 % de plus.

Azote total

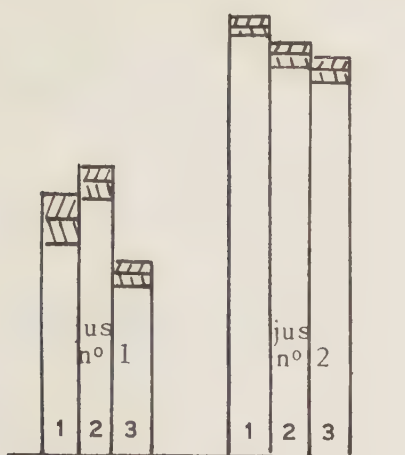


Figure n° 12

Ces résultats sont illustrés par l'histogramme ci-contre, figure n° 12 et la notation, 1-2-3, qui sera la même par la suite, signifie :

- 1 — jus dépectinisé
- 2 — jus collé à la gélatine
- 3 — jus collé à la bentonite

Les molécules azotées qui sont adsorbées par la bentonite sont des protéines et aussi pour le jus n° 2, plus riche en azote total que l'autre, des composés amidés.

Il y a 38,7 % d'azote protéinique de moins dans le jus collé à la bentonite que dans le jus dépectinisé pour le jus n° 1, et 31,7 % de moins, pour le jus n° 2, comme l'illustre l'histogramme n° 13.

La teneur en azote amidé du jus collé à la bentonite, comparée à celle du jus dépectinisé, ne change pas, dans le cas du jus n° 1, mais est plus faible de 27 % environ pour le jus n° 2, comme le montre l'histogramme n° 14.

Azote protéinique

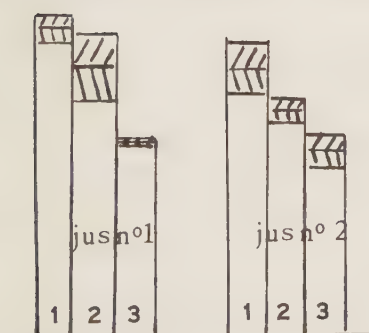


Figure n° 13

Azote amidé

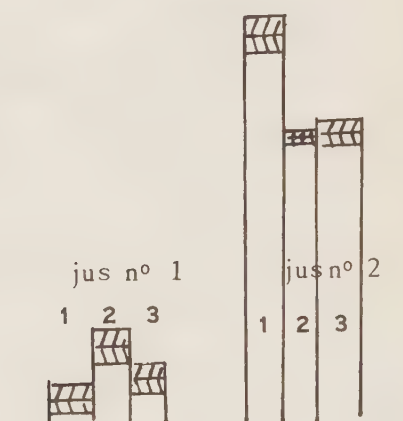


Figure n° 14

Cet histogramme fait ressortir aussi l'accroissement considérable de l'azote amidé du jus n° 1, après son collage à la gélatine dont la teneur est 4,5 fois plus grande qu'après dépectinisation.

Les deux histogrammes suivants, n° 15 et n° 16, concernent l'azote ammoniacal et l'azote de formoltitration.

Pour les deux jus de pomme, on trouve plus d'azote ammoniacal, après collage à la bentonite qu'avant et, entre les jus collés à la gélatine et les jus collés à la bentonite, on constate que les jus collés à la bentonite en renferment un peu plus.

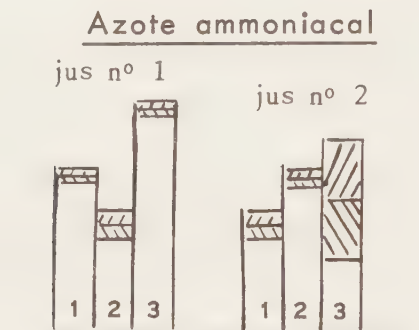


Figure n° 15

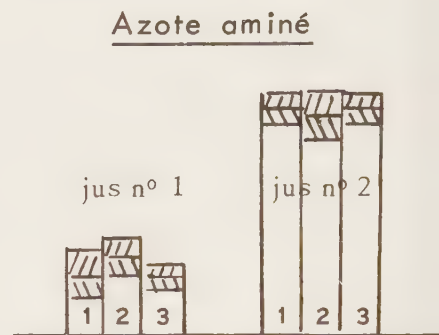


Figure n° 16

Par contre, les teneurs en azote de formoltitration ne sont pas affectées par le collage à la bentonite qui n'en adsorbe pas. Elles sont les mêmes dans les jus collés à la gélatine ou collés à la bentonite.

On remarque enfin que la teneur en azote aminé du jus n° 2 est bien supérieure à celle du jus n° 1, et il en est de même pour l'azote amidé.

V - Analyse du précipité de collage à la bentonite -

Puisque la bentonite adsorbe des protéines, nous avons essayé d'identifier ces composés dans les précipités de collage de jus de pomme traités à la bentonite.

a) - Collage à la bentonite d'un jus de pomme prêt à l'embouteillage, avant filtration

Ce jus, qui est trouble, a les caractéristiques suivantes :

— densité.....	1 047,5
— acidité totale	5,2 g/l
(en acide malique)	
— azote total	67,0 mg/l

(la teneur en azote total est la moyenne de 4 dosages).

Le jus est collé, en éprouvettes, à raison de 100 mg/l de bentonite. Une fois dépouillé, soit après quelques heures de repos, le jus est filtré sur papier-filtre et on entraîne tout le précipité sur le filtre.

On dose l'azote total contenu dans le filtrat, et l'azote total et l'azote protéinique dans le précipité de collage.

Les résultats des dosages sont exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

— Azote total du filtrat (moyenne de 2 dosages).....	3,01 mg
— Azote total du précipité de collage (moyenne de 4 dosages).....	0,217 mg
— Azote protéinique du précipité de collage (moyenne de 2 dosages)	0,168 mg

La teneur en azote total du jus, avant le collage à la bentonite, est de 3,395 mg pour 50 cm³.

On retrouve :

dans le filtrat 3,01 mg
 dans le précipité..... 0,217 mg
 soit 3,227 mg

Avec une erreur de 7 %, la concordance est bonne.

b) — Collage à la bentonite du jus de pommes douces n° 1 préparé en janvier 1966
(bouteilles gardées au frais)

Le jus est trouble et il y a un dépôt dans le fond des bouteilles. On filtre sur papier. Le filtrat est encore trouble et le filtre retient un précipité grumeleux qui est soumis à une détermination d'azote total.

On trouve 0,84 mg d'azote, pour un litre, soit 0,042 mg pour 50 cm³ de jus.

Le jus filtré est ensuite collé à la bentonite à raison de 300 mg/litre et à nouveau filtré sur papier.

Dans le tableau n° 17, nous avons rassemblé les résultats, exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus, des dosages des diverses formes de l'azote
 dans le jus filtré avant collage à la bentonite,
 dans le jus collé à la bentonite et filtré,
 dans le précipité de collage

	jus filtré	jus collé à la bentonite et filtré	Précipité de collage
Azote total	2,03	1,715	0,28
Azote ammoniacal	0,1575	0,245	0,07
Azote amidé	0,1225	0,070	—
Azote protéinique	0,980	0,560	0,28

Tableau n° 17

En faisant la somme de l'azote total trouvé dans le jus collé à la bentonite et filtré, et de l'azote total trouvé dans le précipité, on retrouve bien, à 1,7 % près, l'azote total du jus avant collage à la bentonite.

On remarque aussi que les 0,28 mg d'azote total du précipité sont de l'azote protéinique.

VI - Collage à la gélatine alimentaire -

La gélatine alimentaire, employée à la même concentration que la gélatine en perles, au collage des jus de pommes douces, permettrait de déterminer plus facilement le point de colle et ce point de colle serait plus bas que celui de la gélatine en perles.

L'analyse de cette gélatine montre qu'elle est plus riche en azote total que la gélatine en perles et qu'elle ne renferme ni amino-acides, ni amides.

Dans le tableau n° 18, sont rassemblées les moyennes des différentes formes de l'azote dans la gélatine en perles, et, pour la gélatine alimentaire, les valeurs correspondantes, indiquées, sont les moyennes de 4 ou 5 dosages. Les résultats sont exprimés en mg d'azote pour 100 mg de gélatine.

	Gélatine en perles	Gélatine alimentaire
Azote total	14,581	15,17
Azote ammoniacal	0,2695	0,98
Azote de formoltitration	1,5365	-
Azote amidé	0,2345	-
Azote protéinique	14,056	14,84

Tableau n° 18

Au mois d'octobre 1967, sur un lot de pommes douces, nous avons comparé le pouvoir clarifiant de ces deux gélatines.

Les jus de 10 cuves de 170 hl sont collés avec une solution de gélatine en perles, puis 10 autres cuves sont collées avec de la gélatine alimentaire.

Les points de colle sont :

— avec la gélatine en perles :

71 — 60 — 70 — 81 — 73 — 73 — 60 — 72 — 71,5 — 78

soit en moyenne : 71

— avec la gélatine alimentaire :

85 — 75 — 65 — 75 — 70 — 65 — 70 — 80 — 70 — 80

soit en moyenne : 73,5

Les jus de pomme collés avaient une densité comprise entre 1048 et 1051, un pH de 3,6 à 4,0 et une acidité totale exprimée en acide malique, de 2,3 à 2,8 g/litre.

Puisque les points de colle sont semblables, on ne peut pas dire que la gélatine alimentaire soit plus efficace que la gélatine en perles.

Un nouvel essai est fait au laboratoire, en collant un jus de pomme, de caractéristiques :

densité.....	1.048
pH	3,9
acidité totale	3,0 g/l
(en acide malique)	

Les points de colle, déterminés séparément pour chaque gélatine, sont encore les mêmes : 45 g/hl, mais on s'aperçoit que le dépouillement du jus collé à la gélatine alimentaire est beaucoup plus lent à se faire, et, qu'après deux heures de repos, les volumes de lies, pour 250 cm³ de jus, sont :

- pour le collage à la gélatine en perles 60 cm³
- pour le collage à la gélatine alimentaire 75 cm³

En parallèle à cet essai en laboratoire, une éprouvette de ce jus de pomme est collée à raison de 35 g/hl de gélatine en perles et de 11 g/hl de bentonite.

La vitesse de dépouillement du jus est comparable à celle du jus collé à la gélatine en perles, et le volume des lies, après 2 heures de repos, est de 58 cm³ de jus.

Avant collage, et après les 2 modes de collage et filtration sur papier, nous avons dosé l'azote total, et nous avons trouvé :

	Azote total mg/litre
jus dépectinisé, avant collage	86,8
jus collé à la gélatine en perles	78,4
jus collé à la gélatine alimentaire	78,4
jus collé à la gélatine et bentonite	72,8

Dans le jus collé à la gélatine, gélatine en perles ou gélatine alimentaire, il y a, dans le jus, 9,5 % d'azote total en moins, alors qu'après collage à la gélatine et à la bentonite, il y en a 16 % en moins.

Cela montre ainsi l'efficacité plus grande du collage combiné à la gélatine et à la bentonite.

VII - Collage à la bentonite du concentré de jus de pomme n° 1 -

Le pouvoir d'adsorption de la bentonite, vis-à-vis des protéines ayant été ainsi mis en évidence, après ces deux essais sur des jus de pommes douces, nous avons essayé de coller, directement, à la bentonite, un concentré de jus de pommes douces.

Le concentré choisi est celui qui correspond au passage, dans le concentrateur, du jus n° 1, collé à la gélatine et filtré.

A sa sortie du concentrateur, le concentré est légèrement trouble et ce trouble s'accroît avec le temps. Des échantillons sont conservés au frais et à la température ambiante.

On colle le concentré à raison de 400 mg/litre de bentonite.

Au témoin, on ajoute un volume d'eau distillée égal à celui de l'émulsion de bentonite employée.

Les densités des concentrés sont :

— concentré témoin 1355

— concentré collé à la bentonite 1354

Des petits flocons apparaissent dans le concentré, 15 heures après l'addition de la bentonite. Les flocons grossissent, et, au bout de 40 heures, la floculation est très importante et intéresse toute la masse du concentré.

On le filtre sur kieselghur.

Le filtrat est limpide et brillant, ses dilutions sont brillantes et stables (épreuves de tenue au chaud et au froid).

On dose l'azote, sous ces différentes formes, dans ces concentrés et les résultats, exprimés en mg d'azote pour 100 g de concentré, sont :

a) — concentré témoin

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	29,40	0,53
Azote ammoniacal	10	2,80	0,27
Azote de formoltitration	10	0	0
Azote amidé	10	1,54	0,17
Azote protéinique	9	16,49	0,41

Les dix titrations d'azote de formoltitration sont nulles ; il n'y a plus d'acides aminés libres dans ce concentré.

b) — concentré collé à la bentonite

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	26,53	0,28
Azote ammoniacal	10	2,52	0,21
Azote de formoltitration	10	0	0
Azote amidé	10	1,442	0,29
Azote protéinique	10	12,18	0,66

La comparaison des moyennes donne :

	t
Azote total	4,75
Azote ammoniacal	0,80
Azote amidé	0,28
Azote protéinique.....	5,30

Le concentré collé à la bentonite ne renferme pas, non plus, d'acides aminés libres, titrables par formoltitration.

Il est moins riche en azote total que le témoin et cette différence concerne l'azote protéinique, comme le montre l'histogramme n° 19.

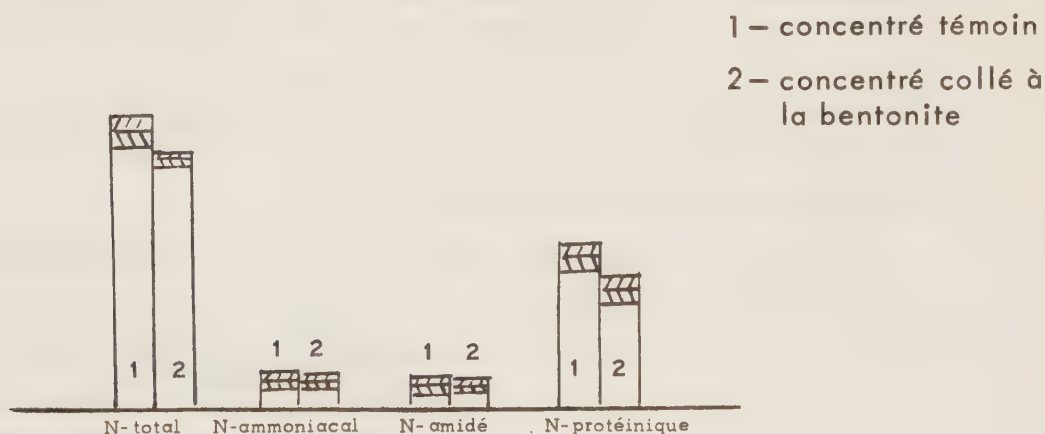


Figure n° 19

Il se confirme ainsi que la bentonite adsorbe des protéines et, pour les jus, le collage à la bentonite en enlève plus que le collage à la gélatine.

Koch (15) et Ribereau-Gayon & Peynaud (16) indiquent d'ailleurs que la bentonite fixe énergiquement les protéines naturelles du jus.

VIII - Collage à la bentonite d'un jus de pommes aigres et d'un concentré de jus de pommes aigres -

Les pommes aigres donnent des jus qui se collent très facilement. En général, le point de colle se situe entre 8 et 15 g/hl de gélatine.

Les concentrés que l'on obtient avec des jus acides sont limpides et brillants et donnent des dilutions stables.

Mais quand un jus de pomme est sorti de la cave de garde pour être conditionné en bouteilles ou en boîtes, il est presque toujours voilé ou trouble, alors qu'il a été mis en cuve de garde, limpide et brillant.

Ce trouble plus ou moins important pourrait être dû à un excès de gélatine, et, pour nous en rendre compte, nous avons collé, comparativement, à la gélatine et à la bentonite, en décembre 1966, un jus de pommes aigres.

a) - Action de la bentonite sur la gélatine

A 100 cm³ de solution de gélatine à 3 %, on ajoute 10 cm³ d'émulsion de bentonite à 3 %. On agite et laisse au repos.

Après 2 heures environ, le liquide de l'éprouvette se sépare en deux : de l'eau incolore à la partie supérieure de l'éprouvette et une masse blanchâtre qui tombe au fond de l'éprouvette.

La bentonite a collé la solution de gélatine.

b) - Collage à la bentonite d'un jus de pommes aigres

Début décembre 1966, nous avons collé comparativement, à la gélatine et à la bentonite, un jus de pommes aigres de caractéristiques :

densité 1056,5
acidité totale 4,2 g/l
(en acide malique)

Le point de colle est de 9 g/hl.

Les résultats des dosages d'azote, exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus, sont les suivants :

	jus collé, gélatine		jus collé, bentonite	
	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$
Azote total	5	2,94	5	2,716
Azote ammoniacal	6	0,163	6	0,420
Azote aminé	6	1,88	5	2,296
Azote amidé	6	0,350	6	0,081
Azote protéinique	2	1,05	2	0,805

Le test "t", de la comparaison des moyennes, donne un résultat significatif, pour :

l'azote total

l'azote ammoniacal

l'azote amidé

Il n'est pas significatif pour l'azote de formoltitration.

A nouveau, on a confirmation que le collage à la bentonite, en éliminant plus de composés azotés que le collage à la gélatine, adsorbe des protéines bien que nous n'ayons pas tiré la signification des moyennes des 2 dosages de l'azote protéinique du jus collé à la gélatine et du jus collé à la bentonite.

Il n'y a pas d'adsorption d'acides-amino par la bentonite, comme on l'a déjà constaté, par contre on relève toujours son apport d'azote ammoniacal.

c) — Collage à la bentonite d'un concentré de jus de pommes aigres

Pour cet essai, on choisit un concentré brillant, de 1965 qui a une densité de 1369 et une acidité totale, exprimée en acide malique, de 36 g/litre.

A 500 cm³ de concentré, on ajoute 10 cm³ d'émulsion de bentonite à 3 % et mélange.

Après une nuit de repos, il y a de gros flocons dans le concentré.

Il ressort de cet ensemble de résultats de collage à la bentonite de jus et concentrés de jus de pomme, qu'il est possible d'éviter le surcollage quand on emploie la gélatine pour la préparation des jus, et de clarifier les concentrés voilés ou plus ou moins troubles.

Pour le collage des jus de pommes douces, en combinant l'action de la gélatine à celle de la bentonite, il est possible :

— d'une part, d'enlever l'astringence du jus que donnent les tanins, en collant, en partie, à la gélatine,

— d'autre part, d'éliminer les grosses molécules azotées telles que protéines et peptides, en employant un peu de bentonite.

*

* *

EVOLUTION DES COMPOSES AZOTES
DU JUS DE POMMES DOUCES N° 1 AU COURS DE LA
CONSERVATION ET DANS DES CONDITIONS DE GARDE DIFFERENTES

Des bouteilles de jus de pomme n° 1 sont conservées à la température ambiante, au laboratoire, soit à + 20 ° environ, et au frais dans la cave de garde de l'usine, à une température au plus égale à + 15 + 16 °.

Au mois d'avril 1966, après 3 mois de conservation, les jus sont analysés et les résultats, exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus, sont les suivants :

a) — jus de pomme conservé au frais

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	2,6845	0,038
Azote ammoniacal	10	0,315	0,023
Azote de formoltitration	10	0,833	0,10
Azote amidé	10	0,112	0,014
Azote protéinique	10	1,295	0,028

b) — jus de pomme gardé à la température ambiante

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	2,751	0,070
Azote ammoniacal	10	0,3575	0,024
Azote de formoltitration	10	1,0005	0,09
Azote amidé	10	0,164	0,038
Azote protéinique	10	1,2285	0,028

Le test " t ", de comparaison des moyennes, n'est significatif pour aucune des formes de l'azote.

Après 3 mois de conservation, il n'y a pas de différence dans les teneurs en azote, sous ses diverses formes, dans les jus, qu'ils aient été gardés au frais ou à la température ambiante.

*
* *

EVOLUTION DES COMPOSES AZOTES
DANS LE CONCENTRE DE JUS DE POMME N° 1
AU COURS DE SA CONSERVATION ET DANS DES
CONDITIONS DE GARDE DIFFERENTES

Les 170 hl de jus de pomme n° 1 collés à la gélatine et filtrés sont concentrés sous vide.

Des échantillons de concentré sont pris pendant le passage du jus dans le concentrateur et sont conservés au frais et au laboratoire, à la température ambiante.

Le temps nous a manqué pour faire les dosages de toutes les formes de l'azote dans le concentré, quelques jours après sa fabrication, mais nous avons déterminé :

- l'azote ammoniacal
- l'azote de formoltitration
- l'azote amidé

ces formes de l'azote étant celles qui pouvaient évoluer le plus avec le temps et les conditions de conservation.

I- Les échantillons sont analysés après 3 mois de conservation, et les résultats qui suivent sont exprimés en mg d'azote pour 100 g de concentré.

a) — azote ammoniacal

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Concentré sortant du concentrateur	10	3,43	0,287
Concentré gardé au frais	10	2,835	0,211
Concentré gardé à la température ambiante	10	2,31	0,196

Les teneurs en azote ammoniacal du concentré gardé au frais et du concentré gardé à la température ambiante sont les mêmes, puisque $t = 1,82$.

D'autre part, on ne trouve pas de différence, dans les teneurs en azote ammoniacal des concentrés sortant du concentrateur et gardés au frais, t étant égal à 1,66.

Il n'y a donc pas de modification dans les teneurs en azote ammoniacal dans les concentrés quelques soient leurs conditions de conservation.

b) — azote de formoltitration

Nous n'avons pas trouvé d'azote de formoltitration dans les échantillons de concentré conservés 3 mois au frais et à la température ambiante, mais quelques jours après sa fabrication, il y en avait 14,14 mg (moyenne de 10 dosages) et l'écart-type de cette moyenne est : 0,796.

c) — azote amidé

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Concentré sortant du concentrateur	10	1,568	0,325
Concentré gardé au frais	10	1,8585	0,352
Concentré gardé à la température ambiante	11	2,641	0,355

Comme pour l'azote ammoniacal, on ne trouve pas de différence dans les teneurs en azote amidé de ces 3 échantillons.

En effet, entre la valeur moyenne de l'azote amidé du concentré gardé au frais et celle du concentré gardé à la température ambiante, $t = 1,52$; entre celle du concentré sortant de l'évaporateur et celle du concentré gardé au frais, $t = 0,60$.

Ce concentré obtenu à partir d'un jus surcollé, comme on l'a vu, manque de brillant, et, avec le temps, il devient franchement voilé.

Si dans les 3 échantillons analysés, les teneurs moyennes en azote ammoniacal et amidé sont les mêmes, après 3 mois de garde au frais et à la température ambiante, il n'y a plus d'azote aminé dans le concentré. Lüthi (7) et Pribela & Betusova (17) ont d'ailleurs signalé que les acides aminés disparaissaient rapidement dans les concentrés.

L'histogramme n° 20 illustre ces résultats :

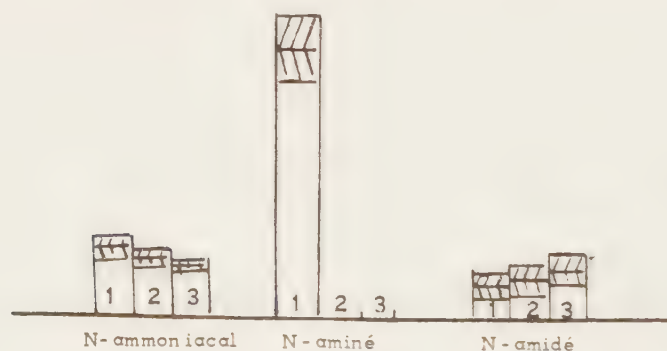


Figure n° 20

- 1 - concentré sortant du concentrateur
- 2 - concentré gardé au frais
- 3 - concentré gardé à la température ambiante.

c) - l'azote total dans les concentrés gardés 3 mois

	Nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Concentré gardé au frais	10	31,57	0,63
Concentré gardé à la température ambiante	10	32,83	0,85

La comparaison des moyennes n'est pas significative, " t " étant égal à 1,17.

d) - l'azote protéinique dans les concentrés gardés 3 mois

	Nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Concentré gardé au frais	10	16,59	0,61
Concentré gardé à la température ambiante	9	18,2	0,89

Comme pour l'azote total, le résultat du test " t " n'est pas significatif ($t = 1,83$).

II - Remarques sur le trouble des dilutions de certains concentrés -

Dans le commerce on trouve des boissons préparées à partir de concentré de jus de pomme et il arrive, parfois, qu'elles se troublent au bout d'un certain temps.

L'aspect du trouble est le même que celui qui est observé dans les jus de pomme.

On a isolé par filtration le trouble de 6 bouteilles de 0,5 l de cette boisson. L'azote total y représente :

0,644 - 0,728 - 0,532 - 0,588 - 0,560 - 0,644
milligrammes d'azote, pour 500 cm³.

Les poids des précipités variant de 20 à 55 mg, l'azote total y entre pour 1,2 à 3,2 %.

*
* *

ACTION DES ENZYMES PROTEOLYTIQUES SUR LES COMPOSES AZOTES DES JUS DE POMME ET CONCENTRES DE JUS DE POMME

Il arrive parfois qu'un jus de pomme, parfaitement limpide après sa mise en bouteilles et pasteurisation, se voile au cours de sa conservation, et ce voile peut être plus ou moins prononcé.

De même, certains concentrés donnent des dilutions qui se voilent et il arrive même que l'on observe une précipitation dans les dilutions.

On a pensé que ces accidents, comme ceux relevés autrefois dans la bière, étaient d'origine protéidique et l'emploi des enzymes protéolytiques, pour les éviter, tend à se généraliser.

Nous avons donc étudié l'action de l'un de ces enzymes sur des jus de pomme et sur des concentrés de jus de pomme.

L'enzyme que nous avons employé est de la diasproline concentrée, soit 10 fois plus active que la diasproline ordinaire.

I - Analyse de l'enzyme -

Les différentes formes de l'azote sont déterminées sur une solution à 2 g/litre de diasproline et les résultats sont exprimés en mg d'azote pour 100 mg d'enzyme.

	Nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	2,016	0,038
Azote ammoniacal	10	0,392	0,018
Azote de formoltitration	10	0,714	0,0139
Azote amidé	9	0,0404	0,0209
Azote protéinique	10	1,491	0,0531

II - Effets de la diasproline sur les composés azotés du jus de pommes douces n° 1 -

Le jus de pomme n° 1, fabriqué en janvier 1966, est traité à la diasproline, à raison de 100 mg/litre.

On laisse agir 5 jours au frigidaire, à une température comprise entre + 3 et 4° C (ce qui est réalisé dans la pratique) ; et on ajoute 400 mg/l de benzoate de soude pour éviter tout départ en fermentation.

Le jus est ensuite pasteurisé pour inactiver l'enzyme.

Le jus témoin reçoit également 400 mg/l de benzoate et est pasteurisé.

A 50 cm³ de jus, l'enzyme apporte :

- azote total 0,100 mg
- azote ammoniacal..... 0,019 "
- azote de formoltitration 0,035 "
- azote amidé —
- azote protéinique 0,075 "

Les résultats des dosages d'azote, exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus, dans les jus, témoin et traité à la diasproline, sont les suivants :

Jus témoin

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	3,034	0,081
Azote ammoniacal	10	0,413	0,05
Azote de formoltitration	10	0	0
Azote amidé	10	0,1393	0,030
Azote protéinique	10	1,211	0,069

Jus traité à la diasproline

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	3,255	0,13
Azote ammoniacal	10	0,4165	0,011
Azote de formoltitration	10	0,5075	0,04
Azote amidé	10	0,15715	0,051
Azote protéinique	10	1,400	0,038

La comparaison des teneurs moyennes en azote, sous ses différentes formes, des jus témoin et traités à la diasproline, donne pour " t ", les valeurs suivantes :

- azote total t = 1,47 résultat non significatif
- azote ammoniacal t = 0,06 résultat non significatif
- azote amidé t = 0,30 résultat non significatif

Pour l'azote protéinique, t = 2,39, mais en tenant compte de ce qu'apporte l'enzyme, t = 1,44, on n'observe pas de changement ainsi dans cette forme de l'azote.

Pourtant l'azote de formoltitration qui a été dosé dans le jus traité à la diasproline, alors qu'il n'y en avait pas dans le jus témoin, ne peut provenir que du clivage de molécules peptidiques ou protéidiques, ce que nous n'avons pu mettre en évidence.

III - Action de la diasproline sur un coupage de jus de pomme -

Le coupage de jus de pomme qui est choisi, a été réalisé avec des jus préparés en octobre et novembre 1966 et ses caractéristiques sont :

- densité 1044
- acidité totale 5,1 g/l
(en acide malique)

Les jus entrant dans ce coupage sont tous troubles.

On le traite à raison de 100 mg/litre, de diasproline et on y ajoute 2 g/l de benzoate de soude pour en assurer la conservation, car on le garde 8 jours, au laboratoire, à une température comprise entre + 8 et + 20° C.

Au bout de ce temps, le jus est pasteurisé.

Au jus témoin, on ajoute du benzoate de soude et on le pasteurise en même temps que le jus traité à la diasproline.

On constate que le trouble disparaît par chauffage, mais le jus se trouble à nouveau en se refroidissant.

Les résultats des dosages de l'azote sont exprimés en mg d'azote pour 50 cm³ de jus.

Témoin

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	3,976	0,029
Azote ammoniacal	10	0,105	0,011
Azote de formoltitration	10	2,107	0,089
Azote amidé	10	0,728	0,012
Azote protéinique	10	0,798	0,029

Jus traité à la diasproline

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
Azote total	10	4,109	0,041
Azote ammoniacal	10	0,147	0,012
Azote de formoltitration	10	2,702	0,044
Azote amidé	10	0,854	0,023
Azote protéinique	10	1,288	0,025

En tenant compte de l'azote qui est apporté au jus, par la diasproline, on obtient, pour " t " les valeurs suivantes :

- azote total t = 0,66
- azote ammoniacal..... t = 1,30
- azote aminé t = 6,09
- azote amidé..... t = 4,70
- azote protéinique t = 10,6

Il y a plus d'acides aminés et d'amides dans le jus traité à la diasproline que dans le témoin, mais, si on trouve plus de protéines dans le jus traité à la diasproline, protéines apportées par l'enzyme, on n'a pu établir l'origine des aminoacides et amides du jus traité, comme pour le jus de pomme n° 1.

IV - Chromatographie des acides aminés -

L'action de la diasproline se manifeste, en particulier, par l'apparition d'azote de formoltitration dans les jus de pomme.

Avant le traitement à la diasproline, le jus de pomme n° 1 ne contenait plus d'acides aminés et après l'action de cet enzyme on en a trouvé 9,436 mg/litre.

La teneur en acides aminés du coupage de jus de pomme passe de 42,14 mg/litre à 53,34 mg/litre après son traitement à la diasproline (soit une augmentation de 26,5 %).

Cet enrichissement en azote de formoltitration pouvant intéresser d'autres acides aminés que ceux qui sont naturellement dans les jus, nous avons cherché à les séparer par chromatographie sur papier.

La séparation est faite par chromatographie ascendante bidimensionnelle sur papier Whatman n° 1, en employant, comme solvants, les mélanges :

- phénol-eau (4-1)
- n-butanol - acide acétique - eau (4 - 1 - 5)

a) Chromatogrammes des acides aminés purs

Les acides aminés susceptibles d'être rencontrés dans les jus de pomme, soit :

l'acide aspartique,	la leucine,
l'acide glutamique,	la phénylalanine,
l'acide γ - aminobutyrique,	la sérine,
l'alanine,	la tyrosine,
l'asparagine,	la valine,

sont repérés par chromatographie à une dimension, après développement pendant 24 heures, dans le mélange phénol-eau, et 22 heures dans le mélange n-butanol - acide acétique - eau.

Les spots correspondants à ces aminoacides sont révélés par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,2 % dans du n-butanol.

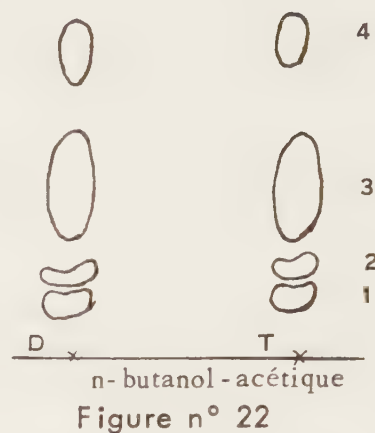
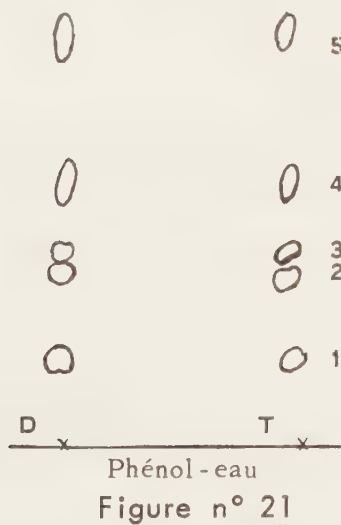
b) - Séparation des acides aminés d'un jus de pomme par chromatographie à une dimension

A un coupage de jus de pomme non filtré, de densité 1045,5 et d'acidité totale, exprimée en acide malique, de 5,5 g/litre, on ajoute 200 mg/litre de diasproline.

On laisse agir 15 jours à la température ambiante, le jus étant stabilisé par du benzoate de soude.

Un même volume de jus de pomme témoin, repéré T sur les chromatogrammes, et de jus traité à la diasproline, repéré D, est appliqué, au départ, sur le papier.

Dans le mélange phénol-eau, le développement dure 20 heures, et, dans le mélange n-butanol - acide acétique - eau, 24 heures.



Les 5 spots révélés à la ninhydrine, après développement dans le mélange phénol-eau, ont le même emplacement qu'ils soient du jus témoin ou du jus traité à la diasproline.

Il en est de même des 4 spots révélés sur le chromatogramme obtenu à partir du n-butanol - acide acétique - eau.

Mais l'intensité des couleurs, pour certains, est beaucoup plus vive.

C'est ainsi que les couleurs des spots numérotés 1-2-4 et 5 du jus traité à la diasproline, sur le chromatogramme phénol-eau, sont plus vives que celles des spots correspondants du jus témoin. Le spot n° 5, en particulier, obtenu du jus témoin, est juste perceptible.

Sur le chromatogramme n-butanol - acide acétique - eau, les couleurs des spots repérés 2 et 4, du jus traité à la diasproline, sont beaucoup plus vives que celles des mêmes spots du jus témoin.

Si l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'acides aminés chromatographiée, il y aurait alors plus d'acides aminés correspondants à ces spots.

On a confirmation ainsi de l'augmentation de l'azote de formoltitration dans les jus traités à la diasproline.

c) - chromatographie bidimensionnelle des jus de pomme

Les chromatogrammes à 2 dimensions que l'on obtient à partir des jus de pomme témoin et traités à la diasproline, après un développement de 22 heures dans le phénol saturé d'eau, puis le n-butanol - acide acétique - eau, sont reproduits, ci-après, figures n° 23 et 24.

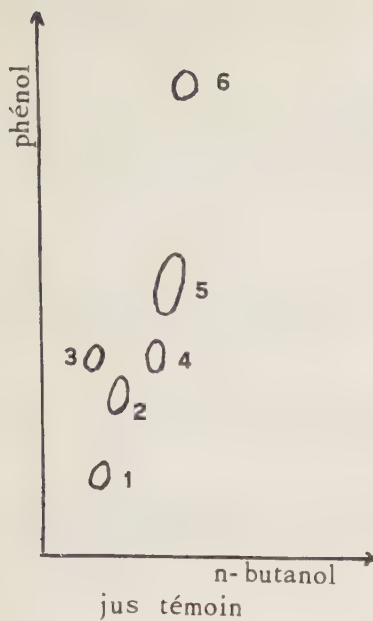


Figure n° 23

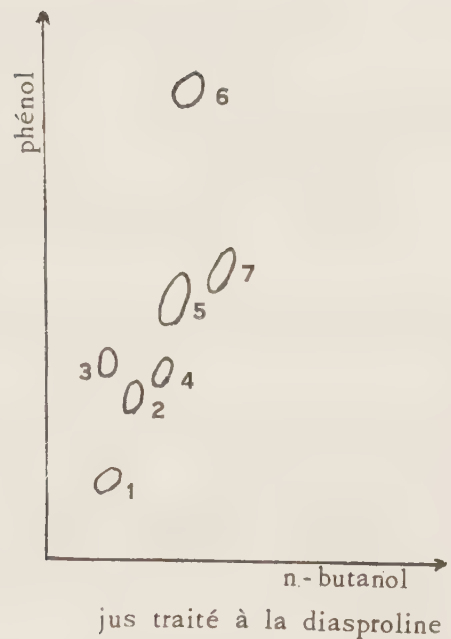


Figure n° 24

Sur ces chromatogrammes, on a identifié :

- 1 — l'acide aspartique
- 2 — l'acide glutamique
- 3 — l'asparagine

- 4 — la sérine
- 5 — l'alanine
- 6 — l'acide γ -aminobutyrique.

Nous ne sommes pas sûrs, cependant, de l'identification de l'acide γ -aminobutyrique.

Le spot repéré 7, sur le chromatogramme du jus traité à la diasproline, n'a pas été identifié.

En augmentant le nombre d'applications de jus traité à la diasproline, au départ, et après 3 semaines d'action de l'enzyme, on obtient un chromatogramme différent, figure n° 25.

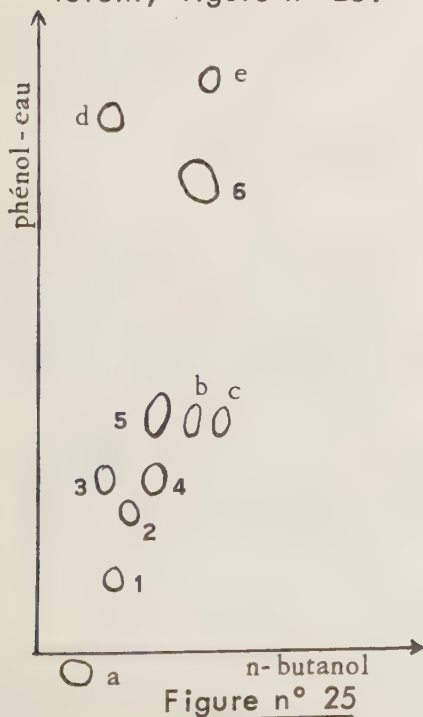


Figure n° 25

On y décèle 11 spots nettement différenciés.

L'identification de l'acide aspartique (1), de l'acide glutamique (2), de l'asparagine (3), de la sérine (4) et de l'alanine (5), est certaine ; celle de l'acide γ -aminobutyrique (6) ne l'est pas comme cela était sur les chromatogrammes n° 23 et 24 ; la concordance des spots de cet aminoacide n'étant pas totale avec ceux des chromatogrammes témoins des acides aminés purs.

On remarque sur ce chromatogramme, l'apparition de 5 spots, repérés a - b - c - d - e, que nous n'avons pas identifiés.

Certains d'entre eux pourraient être des peptides.

Au mois d'octobre 1967, de nouvelles chromatographies d'acides aminés de jus de pomme sont faites à partir d'un jus mis en bouteilles et pasteurisé, de caractéristiques :

- densité 1046
- acidité totale 5,6 g/l
(en acide malique)

On ajoute 200 mg/litre de diasproline, au jus de pomme, et laisse agir 26 jours à la température ambiante.

Les échantillons de jus témoin et traités à la diasproline sont stabilisés avec du benzoate de soude.

Les développements dans le phénol saturé d'eau et ne n-butanol acide acétique — eau durent 22 heures et on obtient les chromatogrammes n° 26 et 27 suivants.

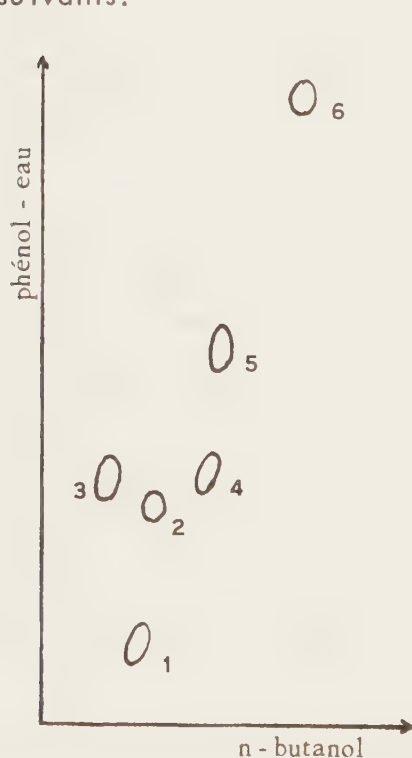


Figure n° 26



Figure n° 27

Les couleurs des spots de l'acide aspartique (1), de l'acide glutamique (2), de la sérine (4) et probablement de l'acide γ -aminobutyrique (6), sont plus vives sur le chromatogramme du jus traité à la diasproline que celles des mêmes spots du jus témoin, les volumes de jus appliqués, au départ, étant les mêmes.

D'autre part, on ne décèle pas d'asparagine sur le chromatogramme du jus traité à la diasproline, mais on y voit 2 spots non identifiés, repérés a et b.

V - Effets de la diasproline sur les composés azotés du concentré de jus de pommes douces n° 1 -

A 500 cm³ de concentré de jus de pommes douces n° 1, prélevé au moment du passage, dans le concentrateur, de ce jus, on ajoute 200 mg de diasproline dissout dans 5 cm³ d'eau distillée.

Au concentré témoin, on ajoute 5 cm³ d'eau distillée.

On garde les 2 échantillons à la température ambiante et laisse agir l'enzyme pendant 112 heures.

Les densités des 2 échantillons de concentré sont 1357.

Pour faire les dosages d'azote, on prépare des dilutions telles qu'à 50 cm³ correspondent 10 g de concentré.

Les dilutions sont pasteurisées avant analyse.

Les résultats des dosages de l'azote, sous ses différentes formes, sont exprimés en mg d'azote pour 100 g de concentré.

a) - azote total

	Nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	10	31,5	0,57
concentré traité à la diasproline	10	34,37	1,13

Le résultat de la comparaison des moyennes est significatif, $t = 2,17$.

On retrouve l'azote total apporté par l'enzyme, car si on le déduit de la moyenne, $t = 1,73$, résultat non significatif.

b) - azote ammoniacal

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	10	2,555	0,22
concentré traité à la diasproline	10	2,450	0,19

La comparaison des moyennes ne donne pas de résultat significatif, même en tenant compte de l'apport de l'enzyme.

Il n'y a pas de modification dans la teneur en azote ammoniacal du concentré traité à la diasproline.

a) — azote de formoltitration

Pour le concentré témoin, comme pour l'échantillon traité à la diasproline, les dix formoltitrations sont nulles.

Il n'y a plus d'acides aminés libres dans ces concentrés et ce qu'apporte l'enzyme, 0,208 mg, n'est pas décelé à l'analyse.

d) — azote amidé

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	9	2,500	0,119
concentré traité à la diasproline	10	1,225	0,093

Le test " t " de la comparaison des moyennes est significatif, $t = 8,4$.

La diasproline agirait sur les composés dosés comme azote amidé.

e) — azote protéinique

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	9	17,11	0,46
concentré traité à la diasproline	10	18,83	0,65

Compte tenu de l'azote protéinique apporté par la diasproline, la comparaison des moyennes ne donne pas de résultat significatif.

VI - Action de la diasproline sur les composés azotés d'un concentré de jus de pomme de la récolte 1966 -

Au mois de mars 1967, nous avons, à nouveau, traité à la diasproline, un concentré de jus de pommes douces de la dernière campagne.

Ce concentré est voilé et donne des dilutions louches.

Son acidité totale, exprimée en acide malique, est de 12 g par kg.

A 500 cm³ de concentré, on ajoute 200 mg de diasproline concentrée, dissout dans 5 cm³ d'eau distillée, et on laisse agir 18 jours à la température ambiante.

Au concentré témoin, on ajoute 5 cm³ d'eau distillée.

Les densités des échantillons sont :

— concentré témoin 1370,5
— concentré traité ... 1371

On prépare des dilutions, qui sont pasteurisées par la suite, dont 50 cm³ correspondent à 5 g de concentré.

En chauffant, le trouble disparaît, mais la dilution se voile à nouveau en se refroidissant.

Les résultats sont exprimés en mg d'azote pour 100 g de concentré.

a) — azote total

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	8	54,775	0,41
concentré traité à la diasproline	8	54,95	1,28

Le test "t" donne, $t = 0,13$, résultat qui n'est pas significatif.

b) — azote ammoniacal

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	8	2,8	0,18
concentré traité à la diasproline	8	2,8	0,18

Les teneurs moyennes, en azote ammoniacal, des deux échantillons sont les mêmes.

c) — azote de formoltitration

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	8	22,4	1,18
concentré traité à la diasproline	8	25,9	0,69

La comparaison des moyennes donne $t = 2,54$.

La diasproline apporte 0,206 mg d'azote de formoltitration à 100 g de concentré ; on a alors $t = 2,39$, résultat significatif.

La diasproline libère des acides-aminés, comme on l'a déjà constaté.

d) — azote amidé

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	8	9,275	0,219
concentré traité à la diasproline	8	9,1875	0,24

$t = 0,26$

Le résultat de la comparaison des moyennes n'est pas significatif.

e) — azote protéinique

	nombre de mesures	moyenne $\bar{x}$	écart-type de la moyenne
concentré témoin	8	12,425	0,48
concentré traité à la diasproline	8	15,225	0,48

La comparaison des moyennes, en tenant compte de ce qu'apporte la diasproline, est significative puisque $t = 3,42$.

L'azote protéinique étant déterminé, après concentration sous vide de la prise d'essai, sur le précipité formé par l'acide phosphotungstique, nous pensons que, pour les concentrés, la précipitation des protéines et polypeptides peut ne pas être complète dans un milieu aussi sirupeux.

Cela expliquerait ainsi pourquoi on ne décèle pas de variation dans la teneur en azote protéinique des concentrés traités à la diasproline.

La manifestation la plus importante de l'action de la diasproline ajoutée à un jus de pomme ou un concentré de jus de pomme, est leur enrichissement en acides aminés et aussi, quelquefois, en composés azotés dosables comme amidés.

Or ces composés sont susceptibles de se combiner à des polyphénols pour former des corps insolubles qui donnent le voile ou le trouble de certains jus de pomme ou concentrés de jus de pomme.

Le traitement en enzymes protéolytiques va donc, dans une certaine mesure, à l'encontre de ce qui est recherché, la limpidité.

On a observé, d'autre part, que les couleurs de quelques spots d'acides aminés des chromatogrammes de jus de pomme traités à la diasproline, étaient plus vives que celles des spots correspondants des chromatogrammes des jus témoins.

C'est le cas, notamment, pour l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine et le spot qui correspondrait à l'acide aminobutyrique.

Cela pourrait signifier qu'il n'y a plus de ces acides aminés dans les jus traités à la diasproline.

Enfin, on a remarqué que des spots non identifiés, étaient révélés par la ninhydrine, sur les chromatogrammes des jus traités à la diasproline.

Ils apparaissent dans les zones de l'alanine, de l'acide aminobutyrique et, dans un cas, près du point de départ du chromatogramme.

Il pourrait s'agir soit d'acides aminés, soit de peptides.

*

* *

BILANS DE L'AZOTE DANS LES JUS DE POMME ET CONCENTRES DE JUS DE POMME

I - Bilans de l'azote dans les jus de pomme -

A côté de l'azote total, nous avons déterminé, dans les jus de pomme :

- l'azote ammoniacal
- l'azote aminé
- l'azote amidé
- l'azote protéidique

Or, par chromatographie, on a trouvé, dans les jus, de l'asparagine qui est titré à la fois comme azote amidé et azote de formoltitration.

Pour les jus de pomme, ne doivent donc figurer au bilan que :

- l'azote ammoniacal
- l'azote de formoltitration
- l'azote protéinique

a) - bilans de l'azote dans le jus de pomme n° 1

	<u>Jus brut</u>	<u>Jus dépectinisé</u>	<u>Jus collé à la gélatine</u>
Azote total	2,751	2,436	2,7745
Azote ammoniacal.....	0,3675	0,3920	0,2695
Azote formoltitration	0,9765	0,5740	0,6505
Azote protéinique	1,7395	1,5785	1,4000
	<u>3,0835</u>	<u>2,5445</u>	<u>2,3200</u>
Erreur % :	12,0	4,4	16,3

	<u>Jus collé à la bentonite</u>	<u>Jus embouteillé pasteurisé</u>
Azote total	1,9145	2,6845
Azote ammoniacal	0,5740	0,315
Azote formoltitration.....	0,5650	0,833
Azote protéinique	0,9695	1,295
	<u>2,1085</u>	<u>2,443</u>
Erreur % :	10,1	8,9

b) — bilans de l'azote dans le jus de pomme n° 2

	jus brut	jus dépectinisé	jus collé à la gélatine
Azote total	4,522	4,480	4,214
Azote ammoniacal	0,3115	0,266	0,4165
Azote formoltitration	2,1105	2,324	2,3345
Azote protéinique	1,5015	1,435	1,1900
	3,9235	4,025	3,9410
Erreur % :	13,2	10,1	6,4

	jus collé à la bentonite	jus embouteillé pasteurisé
Azote total	4,039	4,025
Azote ammoniacal	0,350	0,4060
Azote formoltitration	2,366	2,6915
Azote protéinique	0,980	1,1620
	3,696	4,2595
Erreur % :	8,4	5,8

II - Bilans de l'azote dans les concentrés de jus de pomme -

Après quelques mois de conservation, les concentrés ne renferment plus d'azote de formoltitration, mais on y trouve des composés amidés. Ceux-ci doivent donc figurer aux bilans de l'azote qui sont les suivants :

	Concentré gardé au frais	concentré gardé à t° ambiante
Azote total	31,57	32,83
Azote ammoniacal	2,835	2,310
Azote amidé	1,8585	2,641
Azote protéinique	16,590	18,200
	21,2835	23,151
	concentré collé bentonite	concentré témoin
Azote total	26,53	29,4
Azote ammoniacal	2,52	2,80
Azote amidé	1,442	1,54
Azote protéinique	12,18	16,49
	16,142	20,83

Pour ces bilans, les erreurs sont de :

32,5 % pour le concentré gardé au frais

29,4 % pour le concentré gardé à la température ambiante

39,1 % pour le concentré collé à la bentonite

29,1 % pour le concentré témoin.

*

*

*

CONCLUSION

La modification principale qui se produit dans les composés azotés des jus de pommes douces destinés à la concentration, n'a lieu, en fait, qu'au moment du collage, et la qualité du concentré, sa limpidité, ne dépend que de sa réussite.

Or, nous avons vu que, pour un jus de pommes très douces, comme le jus n° 1, d'acidité totale, exprimée en acide malique, de 1,7 g/l et dont la teneur en azote total n'est que de 55 mg/l, le collage à la gélatine, aussi bien fait soit-il, l'enrichit en azote.

Sa teneur en composés amidés passe de 0,812 mg/l à 3,71 mg/l, soit approximativement 4,5 fois plus.

La gélatine, de plus, abandonne au jus les acides aminés libres qui ont été trouvés dans sa composition et qui se retrouvent dans les jus de pomme mis en bouteilles.

Pour le jus de pomme n° 2, plus acide (3,15 g/l d'acidité malique) et plus riche en azote total (90,44 mg/l), on n'enregistre aucune difficulté au collage. Sa teneur en azote protéinique diminue de 17 %, passant de 28,7 mg/l à 23,8 mg/l.

La marge d'incertitude, dans la réussite du collage à la gélatine, s'étale donc entre des limites d'acidité très larges et, pour cette raison, l'emploi de la bentonite s'avère-t-il indispensable pour cette opération.

La bentonite adsorbe, en effet, les protéines et peptides qu'ils soient naturellement présents dans les jus de pomme ou apportés par la gélatine. On le constate dans les deux jus de pomme étudiés.

La bentonite enlève 38,5 % d'azote protéinique dans le jus n° 1 et 31,7 % dans le jus n° 2. On trouve 26,9 % de moins d'azote amidé dans le jus collé à la bentonite qu'après dépectinisation, dans le jus de pomme n° 2.

Le bilan final de ces deux procédés de collage est, en définitive en faveur de la bentonite, comme nous l'avons vu.

Pour une réussite certaine du collage des jus de pommes très douces, nous estimons qu'il est indispensable d'associer, à la fois, l'action de la gélatine qui élimine en partie, les tanins responsables de l'astringence des jus et celle de la bentonite qui élimine toutes les grosses molécules azotées, génératrices de troubles en se combinant aux polyphénols du jus.

Cette technique de collage mixte, à la gélatine et à la bentonite, a été appliquée, sur des jus de pommes douces, en novembre 1966, et nous avons toujours obtenu de très bons résultats.

Nous avons montré, d'autre part, l'efficacité de la bentonite pour la clarification des concentrés de jus de pommes douces.

Le concentré de jus de pomme n° 1, après collage à la bentonite, renferme 9,7 % d'azote total en moins et cet azote concerne les protéines ou polypeptides précipitables par l'acide phosphotungstique. Après collage à la bentonite, la teneur en azote protéinique du concentré n'est plus que de 12,18 mg/100 g au lieu de 16,49 mg.

En collant à la bentonite, les troubles des jus de pomme, réversibles, c'est-à-dire les troubles qui disparaissent par chauffage, et dont les protéines ou peptides sont la cause, ne sont plus à craindre.

Nous avons constaté, enfin, que la bentonite ne modifiait pas la teneur en azote de formol titration des jus, mais que leurs teneurs en azote ammoniacal étaient légèrement plus élevées.

Le résultat de la dégradation des grosses molécules azotées par les enzymes protéolytiques, est la libération d'acides aminés, comme nous l'avons mis en évidence en étudiant l'action de la diasproline sur les composés azotés des jus et concentrés de jus de pomme.

Dans le jus de pommes douces n° 1, qui ne renferme plus d'azote de formol titration, on en trouve 10,15 mg/litre (exprimés en mg d'azote) après son traitement à la diasproline. Dans le coupage de jus de pomme, il y en a 28 % de plus et dans le concentré fabriqué en 1966, 15,6 %, de plus que dans le concentré témoin.

L'action de la diasproline s'est manifestée, d'autre part, dans le coupage de jus de pomme, par une augmentation de plus de 17 % de sa teneur en azote amidé.

Le phénomène inverse est observé pour le concentré de jus de pomme n° 1 qui voit sa teneur en azote amidé passer de 2,5 mg % à 1,225 mg %, soit 50 % en moins environ.

Cela n'est pas contradictoire, car cette préparation commerciale est un mélange d'enzymes protéolytiques qui, de par leur nature, clivent différemment les grosses molécules azotées.

Nous en avons eu confirmation par chromatographie bidimensionnelle. De nouveaux acides aminés ou peptides apparaissent, la quantité de certains est plus grande.

Ces produits de dégradation des protéines par la diasproline sont susceptibles de se combiner aux polyphénols des jus et concentrés de jus de pomme et donner ainsi naissance à des voiles plus ou moins accentués, irréversibles, comme nous l'avons vu, et ce qui était recherché dans l'emploi de ces enzymes, la stabilité de la limpidité des jus et concentrés de jus de pomme, ne peut être assuré en les employant.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Warcollier - "Cidrerie", Ency. Agri., Baillière édit., 1928.
- 2 - Kieser, Pollard & Timberlake - J. Sci. Food Agri., 1957, 8, 151.
- 3 - Monties & Barret - Ann. Techn. Agri., 1965, 14, (2), p. 167-172.
- 4 - Burroughs - J. Sci. Food Agri., 1957, 8, 122.
- 5 - Pollard - Congrès Int. Jus Fruits, Vienne, 1959.
- 6 - Hulme - Advances in food research, 1958, 8, 297.
- 7 - Lüthi - Symposium Jus Fruits, Bristol, 1958.
- 8 - Williams - Symposium Jus Fruits, Bristol, 1958.
- 9 - Büchi - Symposium Jus Fruits, Bristol, 1958.
- 10 - Jacquin - Ind. Ali & Agri., 1960, N° 9-10, sept.-oct.
- 11 - Rinderknecht & Jurd - Nature, London, 1958, 181, 1268-1269
- 12 - Patron - Thèse, 1949.
- 13 - Ribereau - Gayon & Peynaud - Analyses et Contrôle des Vins, Béranger, édit.
- 14 - Ditz - Ind. Ali. & Agri., 1960, n° 9-10, p. 685-691.
- 15 - Koch - Symposium Jus Fruits, Bristol, 1958.
- 16 - Ribereau-Gayon & Peynaud - Traité d'Oenologie, tome II, Béranger, édit.
- 17 - Pribela & Betusova - Fruchtsaft Ind., 1964, I, Fév.

